

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА
И НУТРИГЕНОМИКА**

Йоана Димитрова Киселова-Кънева

**ПРОУЧВАНЕ НА
АНТИОКСИДАНТНАТА АКТИВНОСТ НА
БЪЛГАРСКИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен
„ДОКТОР”**

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: 01.06.10 – БИОХИМИЯ

**Научни ръководители:
Доц. Татяна Янкова, дб
Доц. Диана Иванова, дб**

**Официални рецензенти:
Доц. Татяна Влайкова, дб
Доц. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, дф**

**Консултант:
Проф. д-р Михаела Мирела Брату, дм
катедра биохимия, факултет по фармация
при Университет “Овидиус”, Констанца, Румъния**

**ВАРНА
2011**

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд обхваща 189 страници, 54 фигури и 15 таблици. Цитирани са 341 заглавия.

Дисертантът е главен асистент в Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в:

- Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна;
- Център по биология на затлъстяването при Университета в Ливърпул, Великобритания;
- Катедра Биохимия, факултет по Фармация при Университета “Овидиус”, Констанца, Румъния.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на
от часа в
.....
на открито заседание на Научното жури

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ | 4 |
| ВЪВЕДЕНИЕ | 5 |
| ЦЕЛ И ЗАДАЧИ | 6 |
| МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ..... | 7 |
| 1. Растения | 7 |
| 2. Растителни екстракти и фракции..... | 7 |
| 3. Определяне на антиоксидантна активност | 8 |
| 4. Определяне концентрацията на полифеноли..... | 9 |
| 5. RP-HPLC анализ..... | 9 |
| 6. Клетъчни линии..... | 9 |
| 7. Субкултивиране на клетъчни култури | 9 |
| 8. МТТ тест за цитотоксичност | 9 |
| 9. Схеми на третиране на клетъчни култури | 9 |
| 10. Използвани означения в експериментите за определяне влиянието на АЕ при експерименти с клетъчни култури | 10 |
| 11. Експериментални животни..... | 11 |
| 12. Определяне нивото на генна експресия | 11 |
| 13. Статистически анализ | 12 |
| РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ..... | 13 |
| 1. АОА на екстракти от български лечебни растения..... | 13 |
| 2. КП в екстракти от български лечебни растения..... | 14 |
| 3. АОА на различни видове фракции от избрани растения | 18 |
| 4. Концентрацията на полифеноли на различни видове фракции от избрани растения..... | 19 |
| 5. RP-HPLC анализ на водно-алкохолен екстракт от <i>Agrimonia eupatoria</i> | 20 |
| 6. Определяне влиянието на t-ButOON върху жизнеността на клетъчни култури..... | 21 |
| 7. Определяне влиянието на АЕ върху жизнеността на клетъчни култури..... | 24 |
| 8. Влияние на АЕ върху експресията на редокс сензитивни гени | 26 |
| 8.1. Влияние на АЕ върху експресията на ензими от обмяната на глутатион..... | 26 |
| 8.2. Влияние на АЕ върху експресията на провъзпалителни фактори..... | 39 |
| 9. Изследване влиянието на АЕ върху концентрацията на тоталните тиоли при експериментални животни | 51 |
| 10. Изследване влиянието на АЕ върху концентрацията на МДА в серум на експериментални животни | 53 |
| ИЗВОДИ | 55 |
| ПРИНОСИ..... | 57 |
| СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В КОНФЕРЕНЦИИ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 58 |

СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|---|-------------------------------------|
| АЕ – екстракт от <i>Agrimonia eupatoria</i> | GSH – редуциран |
| АКФ – активни кислородни форми | глутатион |
| АОА – антиоксидантна активност | GSSG – окислен глутатион |
| БФ – бутанолова фракция | IκB – инхибитор на NF-κB |
| ВФ – водна фракция | IL-6 – интерлевкин-6 |
| ЕАФ – етилацетатна фракция | IKK – киназа на IκB |
| κДНК – копии ДНК | LPS - липополизахариди |
| КП – концентрация на полифеноли | MCP-1 – macrophage |
| МАР киназа – митоген активирана | chemotactic protein |
| протеин киназа | (макрофажен |
| МАРК киназа – киназа на МАР | хемотаксисен протеин) |
| МАРКК киназа – киназа на МАРК | МТТ - 3-(4,5- |
| МДА – малонов диалдехид | диметитиазол-2-ил)-2,5- |
| ОС – оксидативен стрес | дифенилтетразолиум |
| ПЕФ – петролиевоестерна фракция | бромид |
| ПФ – полифенол | NF-κB – нуклеарен |
| ТБК – тиобарбитурова киселина | фактор капа В |
| TME – тотален метанолов екстракт | PBS – Phosphate buffered |
| ТТ – тотални тиоли | saline (изотоничен |
| ХФ – хлороформена фракция | фосфатен буфер) |
| Цит Р450 – Цитохром | PCR – polymerase chain |
| Р450AP-1 – activator protein-1 | reaction (полимеразна |
| (активаторен протеин-1) | верижна реакция |
| ARE/EpRE – | Real-Time PCR – PCR в |
| Antioxidant/Electrophyl | реално време |
| Response Element | RP-HPLC – Reverse phase |
| (Антиоксидант/електрофил | high performance liquid |
| респонсен елемент) | chromatography (обратно |
| CRP – C-reactive protein (C- | фазова високоефективна |
| реактивен протеин) | течна хроматография) |
| DMEM – Dulbecco's Modified | RT-PCR – Reverse Transcription |
| Eagle Medium | PCR (обратна транскрипция – |
| GCL – γ-глутаминцистеин | PCR) |
| лигаза | t-ButOOH – tert-butylhydroperoxide |
| GLUT4 – глюкозен | (третичен бутилов хидропероксид) |
| транспортър тип 4 | TNF-α – tumor necrosis factor alpha |
| GPx4 – глутатион пероксидаза | (тумор некротисен фактор алфа) |
| 4 | XRE – Xenobiotic Response Element |
| GS – глутатион синтетаза | (ксенобиотичен респонсен елемент) |

ВЪВЕДЕНИЕ

Флората на България е забележителна със своето разнообразие – познати са повече от 3900 растителни вида. За поне 750 от тях се знае, че притежават лечебни свойства (Ахтаров, 1939; Китанов, 1953; Стоянов и съавт., 1967, Йорданов и съавт., 1969; Димков, 1979; Петков, 1982, Китанов, 1987). Много често тези свойства се отнасят до лекуване на възпалителни заболявания с различна етиология.

Според Световната здравна организация 80% от населението на Земята разчита на народната медицина при нужда от лечение (Gurib-Fakim et al., 2006). Съвременните проучвания на лечебното действие на растения, традиционно използвани в страни като Китай, Индия, страните от Южна Америка, Средиземноморието и много други, са многобройни и нерядко богатият опит на народната медицина е служил като отправен момент за откриване на нови лечебни средства. В голямата си част тези изследвания се основават на антиоксидантните свойства на съединенията в екстрактите, приготвени от растителен материал.

Според доклад от 2003 година на ВСС (Американска агенция за маркетингови изследвания) (<http://www.bccresearch.com/report/BIO022C.html>), една четвърт от лекарствата, които се предписват в САЩ, Канада и Европа, съдържат активни съставки получени от растения. Освен това, едва 5 до 15% от известните в света 250 000 висши растения са проучени за наличие на биоактивни съставки. Като се има предвид огромното видово разнообразие на растенията, а също така и големият брой идентифицирани съединения с растителен произход, става ясно, че лечебният потенциал на растенията е огромен и все още недостатъчно проучен.

До момента няма данни за системно изследване на лечебите растения, намиращи приложение в Българската народна медицина по отношение на антиоксидантен потенциал.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Изследване на антиоксидантната активност на избрана група български лечебни растения при прилагане на два различни подхода:

1. експерименти *in vitro* за определяне на антиоксидантна активност на екстракти
2. модели *in vivo*, включващи клетъчни култури и експериментални животни

За постигането на тази цел бяха поставени следните

ЗАДАЧИ:

1. Да се определи *in vitro* антиоксидантна активност на водно-алкохолни екстракти от български лечебни растения.
2. Да се определи концентрацията на полифеноли във водно-алкохолни екстракти от избраните растения и степента на корелация с антиоксидантната им активност.
3. Въз основа на резултатите от задача 1 и 2 да се избере група растения с най-висока антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли в техните екстракти и:
 - 3.1. Да се определи *in vitro* антиоксидантна активност на различни видове фракции от избраните растения.
 - 3.2. Да се определи концентрацията на полифеноли в различни видове фракции от избраните растения.
4. От селектираната група да се избере един вид растение, което да бъде изследвано за антиоксидантно действие върху модели на клетъчни култури и експериментални животни, като се проследи влиянието му върху:
 - 4.1. експресията на редокс сензитивни гени в:
 - нестимулирани и оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги
 - адипозна тъкан на плъхове на нормална диета и при модел на индуцирани метаболитни нарушения
 - 4.2. маркери за оксидативен статус в серум и адипозна тъкан на плъхове на нормална диета и при модел на индуцирани метаболитни нарушения

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растения

В настоящото изследване са включени 53 ботанически вида, естествено срещащи се в България. Подбрани са най-широко използваните самостоятелно или в билкови комбинации в ежедневието на хората растения за лечение и профилактика на различни заболявания (Ivanov et al., 1977; Димков, 1979). Растителният материал, използван в проучването, представлява търговски продукти на Съни ООД, Здравец ООД и Талодерма ООД, които се продават без лекарско предписание. Освен българските лечебни растения, като референтни (сравнителни) в проучването са включени и други 4 вида, които са с чужд произход, но популярни със своите лечебни и антиоксидантни качества (Ivanova et al., 2005) и предлагани в аптечната мрежа без предписание.

2. Растителни екстракти и фракции

Водно-алкохолни екстракти за измерване на антиоксидантна активност и концентрация на полифеноли

Приготвяне на 40% водно-етанолов екстракт: изсушеният растителен материал се смилва и 150 mg растителен материал се екстрахира трикратно за по три минути на стайна температура с 40% разтвор на етанол в дестилирана вода (v/v) при съотношение 1g растителен материал на 20ml екстрагент. Супернатантите от всяка от екстракционните стъпки се обединяват и довеждат до общ обем 15ml с 40% етанол.

Водно-алкохолен екстракт от *Agrimonia eupatoria* (АЕ) за третиране на клетъчни култури

Следвана беше същата процедура, както е описана по-горе, но като екстрагент беше използван 40% разтвор на етанол в PBS (pH=7.4). Паралелно по същата схема се приготвя и контролен на екстракта разтвор на етанол в PBS. Така приготвените екстракт (100% концентрат) и разтвор на етанол се разреждат с DMEM хранителна среда (без фенол ред и суплемементи) в концентрации, необходими за съответните експерименти, както следва (табл.1) :

Таблица 1. Схема на приготвяне на работните разтвори на АЕ/разтвор на етанол за третиране на клетъчни култури.

| A (µl) | B (µl) | C (%) | A (µl) | B (µl) | C (%) |
|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 25 | 1975 | 1,25% | 200 | 1800 | 10% |
| 50 | 1950 | 2,5% | 250 | 1750 | 12,5% |
| 100 | 1900 | 5% | 300 | 1700 | 15% |
| 150 | 1850 | 7,5% | | | |

A - Екстракт (100% концентрат) или разтвор на етанол; **B** - DMEM хранителна среда без фенол ред и суплемементи; **C** - Крайно съдържание на екстракт или разтвор на етанол в хранителната среда

Водно-алкохолен екстракт от *Agrimonia eupatoria* за третиране на експериментални животни

Приготвянето на екстракта следваше същата процедурата. Полученият екстракт беше изпаряван във вакуумно-ротационен изпарител. Сухият остатък беше разтварян във вода (група СД+АЕ) или в 12,5% фруктозен разтвор (група Фр+АЕ) до първоначалния обем.

Водно-алкохолен екстракт от *Agrimonia eupatoria* за RP-HPLC анализ

Към 1.125 g ситно нарязани сухи стръкове от камшик са добавени 9 ml 40% разтвор на етанол, с последващо 3 минути разбъркване на вортекс, 3 минути центрофугиране на 10 000 rpm, и отнемане на 6 ml супернатант. Получената утайка е екстрахирана двукратно по същата схема. Сборният екстракт, възлизащ на 23.4 ml, е доведен до 50 ml с 40% разтвор на етанол.

Приготвяне на фракции

Изушеният и фино смлян растителен материал се залива с абсолютен метанол в съотношение 1:20 и се екстрахира в ултразвукова вана при стайна температура в продължение на 30 мин. Полученият екстракт се филтрува и растителният материал се екстрахира още два пъти при същите условия. Трите метанолови екстракта се обединяват и разтворителят се изпарява до сухо и постоянно тегло на остатъка. Това са т. нар. тотални метанолови екстракти (ТМЕ). Последните се разтварят в дестилирана вода в съотношение 1:10 и се екстрахират последователно с различни по полярност разтворители в съотношение 1:1. Получават се съответно петролево-етерна фракция (ПЕФ), хлороформена фракция (ХФ), етилацетатна фракция (ЕАФ) и бутанолова фракция (БФ). Събраните извлекци се сушат над безводен натриев сулфат и концентрират на вакуум-ротационен изпарител до сухо и постоянно тегло. Водният остатък също се изпарява до сухо – водна фракция (ВФ). За анализи изсушеният фракциониран материал беше разтварян в съотношение 10 mg/ml в съответния разтворител, както следва: петролево етерна и хлороформена фракции – в хлороформ; метанолова, етилацетатна и бутанолова – в абсолютен етанол, водна - в дестилирана вода .

3. Определяне на антиоксидантна активност

Антиоксидантната активност (АОА) на водно-етаноловите екстракти и различните видове фракции беше определяна чрез ABTS [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал обезцветяващ метод (Re et al., 1999). АОА е представена като mM еквиваленти пикочна киселина (mM UAE).

4. Определяне концентрацията на полифеноли

Концентрацията на полифеноли (КП) на водно-etanoловите екстракти и различните видове фракции беше определяна посредством спектрофотометричния метод на Singleton и Rossi (1965). КП е представена като mM еквиваленти кверцетин (mM QE) и в mg/g изсушен растителен материал.

5. RP-HPLC анализ

Използван е стандартизиран метод от фармакопейта на САЩ (2007). Качественият и количествен анализ на фенолни съединения е извършен с HPLC система Agilent 1200 с обратнофазова хроматографска колона Zorbax Eclipse XDB-C18. Идентификацията на компонентите е извършена със светодиоден UV детектор при $\lambda=310\text{nm}$ по времената на задържане на фенолните стандарти. Количественото определяне на съдържанието на фенолни съединения бе извършено по метода на външната калибровка.

6. Клетъчни линии

3T3-L1 - непрекъснат субклон на 3T3 (*Swiss albino*) (*Mus musculus*), получен чрез клонална изолация. Клетките са недиференцирани и са с фибробластна морфология.

J774A.1 - моноцитно-макрофажна миша (*Mus musculus*) клетъчна линия. Клетките са с макрофажна морфология и са диференцирани.

7. Субкултивиране на клетъчни култури

За култивиране на клетките беше използвана DMEM хранителна среда с 4,5 g/L глюкоза, L-глутамин и фенол ред и добавени пеницилин, стрептомицин и фетален телешки серум. За приготвяне на разтворите за третиране беше използвана хранителна среда без фенол ред и суплемементи. Клетъчните култури се инкубират на тъмно при 37°C, 5% CO₂.

8. МТТ тест за цитотоксичност

Тестът за цитотоксичност е извършен по метода на Mosmann (1983). Жизнеността на третираните клетки се определя като процент от нетретираната контрола, чиято жизненост се приема за 100%.

9. Схеми на третиране на клетъчни култури

Схема на третиране за определяне на цитотоксичност

0-ев час - посяване на клетъчната култура; **24-ри час** - третиране с t-ButOОН или екстракт; **44-ти час** - МТТ тест.

Схема на третиране при определяне на нивото на генна експресия

0-ев час - посяване на клетъчната култура; **24-ти час** - претретиране с АЕ; **48-ми час** - третиране със 100μМ t-ButOОН; **72-ри час** - изолиране на РНК.

10. Използвани означения в експериментите за определяне влиянието на АЕ при експерименти с клетъчни култури (табл. 2)

Таблица 2. Използвани означения в експериментите за определяне влиянието на АЕ при експерименти с клетъчни култури.

| Означение | Претретиране (24-ти час) | Третиране (48-ми час) |
|-----------------------------|--|-----------------------|
| К (нетретирана контрола) | ХС | ХС |
| АЕ1 | 2,5% КС на АЕ в ХС (за адипоцити) 1,25% КС на АЕв ХС (за макрофаги) | ХС |
| АЕ2 | 5% КС на АЕ в ХС (за адипоцити) 2,5% КС на АЕ в ХС (за макрофаги) | ХС |
| В | ХС | 100μМ t-ButOОН |
| В+АЕ1 | 2,5% КС на АЕ в ХС (за адипоцити) 1,25% КС на АЕ в ХС (за макрофаги) | 100μМ t-ButOОН |
| В+АЕ2 | 5% КС на АЕ в ХС (за адипоцити) 2,5% КС на АЕ в ХС (за макрофаги) | 100μМ t-ButOОН |
| Е1 | 2,5% КС на етанолов разтвор в ХС - контролен на АЕ1 (за адипоцити) 1,25% КС на етанолов разтвор в ХС - контролен на АЕ1 (за макрофаги) | ХС |
| Е2 | 5% КС на етанолов разтвор в ХС - контролен на АЕ2 (за адипоцити) 2,5% КС на етанолов разтвор в ХС - контролен на АЕ2 (за макрофаги) | ХС |
| В+Е1 | 2,5% КС на етанолов разтвор в хранителната среда - контролен на АЕ1 (за адипоцити) 1,25% КС на етанолов разтвор в ХС контролен на АЕ1 (за макрофаги) | 100μМ t-ButOОН |
| В+Е2 | 5% КС на етанолов разтвор в ХС - контролен на АЕ2 (за адипоцити) 2,5% КС на етанолов разтвор в ХС контролен на АЕ2 (за макрофаги) | 100μМ t-ButOОН |

ХС - Хранителна среда; КС - крайно съдържание

11. Експериментални животни

Използвани бяха мъжки плъхове порода Wistar, с изходно тегло 120-150g, отглеждани в помещение с температура $20\pm 25^{\circ}\text{C}$, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина при осигурен постоянен достъп до вода и храна.

11.1. Изследване влиянието на АЕ при плъхове на стандартна диета

Животните бяха разделени на 2 групи (n=6): **Група СД** – животни на стандартна диета (50% скорбяла, 20% протеин, 4,5% мазнини, 5% целулоза, стандартна смес от витамини и минерали); **Група СД+АЕ** – животни на СД, приемащи АЕ.

11.2. Изследване влиянието АЕ при плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Животните бяха разделени на 2 групи (n=6): **Група Фр** – животни на СД, приемащи 12,5% разтвор на фруктоза; **Група Фр+АЕ** – животни на СД, приемащи 12,5% разтвор на фруктоза и АЕ. Метаболитните нарушения бяха верифицирани чрез измерване на теглото, серумни нива на триглицериди, глюкоза и холестерол.

11.3. Получаване на серум и хомогенат от адипозна тъкан

В края на експерименталния период животните бяха упоявани с летална доза тиопентал. Кръв за биохимичните изследвания беше вземана от опашната вена. Адипозна тъкан беше хомогенизирана в съотношение 1g/10 ml 50mM фосфатен буфер, съдържащ 0,1 mM EDTA.

11.4. Определяне концентрацията на тотални тиоли

Използван беше адаптиран метод, основан на способността на реактива на Ellman (5,5 дитио-бис(2-нитробензоена киселина, DTNB) да взаимодейства с тиолатния анион. Като стандарт беше използван разтвор на редуциран глутатион.

11.5. Определяне концентрацията на малонов диалдехид

Концентрацията на малонов диалдехид (МДА) беше определяна по метода на Poter et al. (1976) с тиобарбитурова киселина (ТБК). Като за стандарт е използван МДА.

12. Определяне нивото на гenna експресия

За определяне нивото на гenna експресия беше използван двустъпков количествен Real-Time PCR.

Изолиране на РНК

Изолирането на РНК от клетки и адипозна тъкан беше извършено с помощта на TriReagent, като лабораторният протокол следваше указанията на производителя.

Обратна транскрипция – RT-PCR

PHK беше обратно транскрибирана с помощта на Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, съдържащ олиго (dT)18 праймер и RevertAid™ обратна транскриптаза. Реакцията беше провеждана според указанията на производителя

Количествен Real Time PCR

Анализът е извършен на ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Стойностите на генната експресия са изчислени по $\Delta\Delta C_t$ метода и са изразени в относителни единици в сравнение с нетретираната контрола, при която нивото на експресия се приема за единица. Резултатите са представени като относителни единици \pm SE. Като ендогенна контрола е използван β -актин.

13. Статистически анализ

Там, където не е уточнено допълнително, стойностите са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение на средната стойност (Mean \pm SD). Сравнението на две независими групи е извършено със Student's t-тест, като за достоверни се считаха разликите, за които $p < 0,05$. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистическия софтуерен продукт GraphPad Prism (Ver. 3.03. GraphPad Software, Inc.).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Антиоксидантна активност на екстракти от български лечебни растения

В таблица 3 са представени резултатите от измерването на АОА на 40% водно-етанолови екстракти от 53 вида български лечебни растения в сравнение с АОА на екстракти от референтните растения.

Таблица 3. Антиоксидантна активност на 40% водно-етанолови екстракти.

| Растителен вид | АОА mmol/L UAE | Растителен вид | АОА mmol/L UAE |
|----------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------|
| <i>Cotinus coggygria</i> | 28,48 ± 0,16 | <i>Polygonum aviculare</i> | 4,17 ± 0,12 |
| <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> | 26,60 ± 1,61 | <i>Artemisia gracunculus</i> | 4,10 ± 0,03 |
| <i>Fragaria vesca</i> | 16,13 ± 0,28 | <i>Veronica officinalis</i> | 3,14 ± 0,02 |
| * <i>Camelia sinensis</i> | 14,70 ± 0,29 | <i>Euphrasia officinalis</i> | 2,97 ± 0,11 |
| <i>Hypericum perforatum</i> | 13,49 ± 0,29 | <i>Lavandula angustifolia</i> | 2,80 ± 0,11 |
| <i>Cydonia vulgaris</i> | 13,00 ± 1,00 | <i>Berberis vulgaris</i> | 2,76 ± 0,11 |
| <i>Agrimonia eupatoria</i> | 11,59 ± 0,29 | * <i>Cyclopia intermedia</i> | 2,71 ± 0,10 |
| <i>Origanum vulgare</i> | 11,58 ± 0,38 | <i>Mentha piperita</i> | 2,66 ± 0,12 |
| <i>Rheum officinale</i> | 11,48 ± 0,34 | <i>Matricaria chamomilla</i> | 2,60 ± 0,05 |
| <i>Pelargonium roseum</i> | 10,24 ± 0,08 | <i>Pulmonaria officinalis</i> | 2,39 ± 0,11 |
| <i>Rubus</i> sp. <i>diversa</i> | 10,14 ± 0,28 | <i>Sideritis scardica</i> | 2,31 ± 0,10 |
| <i>Alchemilla vulgaris</i> | 10,04 ± 0,18 | <i>Morus nigra</i> | 2,28 ± 0,22 |
| <i>Melissa officinalis</i> | 9,59 ± 0,11 | <i>Zea mays</i> | 2,25 ± 0,16 |
| <i>Vaccinium myrtillus</i> листа | 9,18 ± 0,48 | <i>Achillea millefolium</i> | 2,10 ± 0,02 |
| <i>Rosa damascena</i> | 8,37 ± 0,14 | <i>Taraxacum officinale</i> | 2,05 ± 0,11 |
| <i>Juglans regia</i> | 7,39 ± 0,14 | <i>Apium graveolens</i> | 1,62 ± 0,06 |
| <i>Sambucus ebulus</i> | 7,22 ± 0,31 | <i>Mentha spicata</i> | 1,61 ± 0,02 |
| <i>Tilia platyphyllos</i> | 7,08 ± 0,19 | <i>Verbena officinalis</i> | 1,60 ± 0,08 |
| * <i>Ilex paraguariensis</i> | 6,86 ± 0,48 | <i>Plantago major</i> | 1,60 ± 0,14 |
| * <i>Aspalathus linearis</i> | 6,77 ± 0,12 | <i>Vaccinium myrtillus</i> плодове | 1,48 ± 0,08 |

| | | | |
|--------------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| <i>Rosa canina</i> | 6,62 ± 0,24 | <i>Calendula officinalis</i> | 1,42 ± 0,05 |
| <i>Thymus</i> sp. | 6,19 ± 0,37 | <i>Urtica dioica</i> | 1,4 ± 0,13 |
| <i>Salvia officinalis</i> | 5,75 ± 0,04 | <i>Galega officinalis</i> | 1,11 ± 0,02 |
| <i>Betula</i> sp. | 5,74 ± 0,18 | <i>Ocimum basilicum</i> | 1,07 ± 0,08 |
| <i>Solidago virga-aurea</i> | 5,51 ± 0,42 | <i>Astragalus glycyphyllos</i> | 0,74 ± 0,03 |
| <i>Crataegus monogyna</i> цвєтєвє | 4,62 ± 0,06 | <i>Prunus spinosa</i> | 0,72 ± 0,05 |
| <i>Frangula alnus</i> | 4,52 ± 0,32 | <i>Capsella bursa-pastoris</i> | 0,66 ± 0,05 |
| <i>Helichrysum arenarium</i> | 4,50 ± 0,32 | <i>Valeriana officinalis</i> | 0,59 ± 0,04 |
| <i>Sambucus nigra</i> | 4,38 ± 0,09 | <i>Onopordon acanthium</i> | 0,52 ± 0,02 |
| <i>Crataegus monogyna</i> плєдєвє | 4,37 ± 0,05 | <i>Humulus lupulus</i> | 0,37 ± 0,04 |

* - Референтни растения

Водно-алкохолните екстракти от *Cotinus coggygia* (AOA 28,48 ± 0,16 mmol/L), *Arctostaphylos uva-ursi* (AOA 26,60 ± 1,61 mmol/L) и *Fragaria vesca* (AOA 16,13 ± 0,28 mmol/L) показаха антиоксидантна активност по-висока от тази на черния чай (AOA 14,70 ± 0,29 mmol/L), като AOA на екстракта от смрадлика е близо 2 пъти по-висока от тази на черния чай. При други 14 вида също беше установена висока AOA, която е и по-висока от тази на референтните растения мате (AOA 6,86 ± 0,48 mmol/L) и ройбос (AOA 6,77 ± 0,12 mmol/L), а екстрактите от още 16 вида показаха AOA по-висока от тази на ханибуш (AOA 2,71 ± 0,10 mmol/L).

2. Концентрация на полифеноли в екстракти от български лечебни растени

В таблица 4 са представени резултатите от измерването на КП в 40% водно-етанолови екстракти от 53 вида български лечебни растения в сравнение с КП на екстракти от референтните растения.

Таблица 4. Концентрация на полифеноли в 40% водно-етанолови екстракти.

| Растителен вид | КП mmol/L QE | КП mg QE /g сух растителен материал |
|-------------------------------------|-----------------|---|
| <i>Cotinus coggygria</i> | 4,65 ± 0,08 | 140,50 ± 2,41 |
| <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> | 4,20 ± 0,03 | 126,99 ± 0,80 |
| <i>Fragaria vesca</i> | 2,93 ± 0,06 | 88,58 ± 1,87 |
| <i>Origanum vulgare</i> | 2,81 ± 0,06 | 84,88 ± 1,79 |
| <i>Melissa officinalis</i> | 2,80 ± 0,03 | 84,70 ± 0,89 |
| <i>Hypericum perforatum</i> | 2,56 ± 0,02 | 78,14 ± 0,65 |
| <i>Rheum officinale</i> | 2,52 ± 0,10 | 76,08 ± 2,94 |
| <i>Cydonia vulgaris</i> | 2,44 ± 0,04 | 73,62 ± 1,18 |
| * <i>Aspalathus linearis</i> | 2,35 ± 0,03 | 70,95 ± 0,98 |
| * <i>Ilex paraguariensis</i> | 2,20 ± 0,07 | 66,35 ± 2,09 |
| <i>Agrimonia eupatoria</i> | 2,10 ± 0,05 | 63,32 ± 1,58 |
| <i>Rubus</i> sp. <i>diversa</i> | 1,74 ± 0,04 | 52,65 ± 1,31 |
| <i>Alchemilla vulgaris</i> | 1,65 ± 0,10 | 49,82 ± 3,05 |
| <i>Sambucus ebulus</i> | 1,59 ± 0,03 | 48,06 ± 0,91 |
| <i>Rosa canina</i> | 1,50 ± 0,08 | 45,34 ± 2,41 |
| <i>Tilia platyphyllos</i> | 1,49 ± 0,10 | 45,00 ± 2,83 |
| <i>Thymus</i> sp. | 1,45 ± 0,05 | 43,93 ± 1,37 |
| <i>Vaccinium myrtillus</i> листа | 1,42 ± 0,01 | 43,00 ± 0,37 |
| * <i>Camelia sinensis</i> | 1,35 ± 0,11 | 40,74 ± 3,38 |
| <i>Salvia officinalis</i> | 1,31 ± 0,02 | 39,55 ± 0,67 |
| <i>Rosa damascena</i> | 1,28 ± 0,02 | 38,68 ± 0,50 |
| <i>Juglans regia</i> | 1,26 ± 0,13 | 38,04 ± 3,87 |
| <i>Frangula alnus</i> | 1,15 ± 0,10 | 34,65 ± 2,98 |
| <i>Solidago virga-aurea</i> | 1,13 ± 0,03 | 34,13 ± 0,80 |
| <i>Berberis vulgaris</i> | 1,09 ± 0,01 | 32,94 ± 0,30 |
| <i>Crataegus monogyna</i> | 1,06 ± 0,04 | 32,04 ± 1,21 |

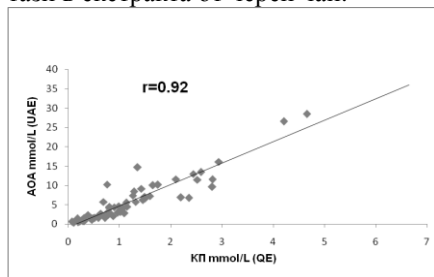
ПЛОДОВЕ

| | | |
|-------------------------------------|-----------------|------------------|
| <i>Artemisia gracunculus</i> | $1,06 \pm 0,15$ | $31,99 \pm 4,41$ |
| <i>Veronica officinalis</i> | $1,02 \pm 0,04$ | $30,77 \pm 1,34$ |
| <i>Crataegus monogyna</i> | $0,99 \pm 0,04$ | $29,77 \pm 1,22$ |
| ЦВЕТОВЕ | | |
| <i>Euphrasia officinalis</i> | $0,96 \pm 0,02$ | $28,95 \pm 0,70$ |
| <i>Sambucus nigra</i> | $0,89 \pm 0,11$ | $27,02 \pm 3,28$ |
| <i>Taraxacum officinale</i> | $0,87 \pm 0,03$ | $26,30 \pm 1,02$ |
| <i>Lavandula angustifolia</i> | $0,81 \pm 0,04$ | $24,37 \pm 1,29$ |
| <i>Helichrysum arenarium</i> | $0,80 \pm 0,02$ | $24,30 \pm 0,65$ |
| <i>Polygonum aviculare</i> | $0,80 \pm 0,03$ | $24,21 \pm 1,03$ |
| <i>Pulmonaria officinalis</i> | $0,78 \pm 0,02$ | $23,65 \pm 0,74$ |
| <i>Pelargonium roseum</i> | $0,75 \pm 0,03$ | $22,71 \pm 0,94$ |
| <i>Mentha piperita</i> | $0,75 \pm 0,03$ | $22,69 \pm 0,82$ |
| <i>Zea mays</i> | $0,73 \pm 0,07$ | $21,94 \pm 1,97$ |
| <i>Verbena officinalis</i> | $0,71 \pm 0,07$ | $21,46 \pm 2,05$ |
| <i>Betula</i> sp. | $0,68 \pm 0,06$ | $20,64 \pm 1,95$ |
| <i>Matricaria chamomilla</i> | $0,64 \pm 0,03$ | $19,34 \pm 0,76$ |
| <i>*Cyclopia intermedia</i> | $0,62 \pm 0,05$ | $18,86 \pm 1,48$ |
| <i>Achillea millefolium</i> | $0,61 \pm 0,07$ | $18,56 \pm 2,16$ |
| <i>Sideritis scardica</i> | $0,59 \pm 0,02$ | $17,92 \pm 0,58$ |
| <i>Mentha spicata</i> | $0,58 \pm 0,00$ | $17,60 \pm 0,00$ |
| <i>Plantago major</i> | $0,51 \pm 0,05$ | $15,38 \pm 0,37$ |
| <i>Vaccinium myrtillus</i> /плодове | $0,48 \pm 0,03$ | $14,51 \pm 0,91$ |
| <i>Galega officinalis</i> | $0,46 \pm 0,03$ | $13,94 \pm 1,02$ |
| <i>Calendula officinalis</i> | $0,44 \pm 0,02$ | $13,43 \pm 0,49$ |
| <i>Morus nigra</i> | $0,39 \pm 0,08$ | $11,68 \pm 2,43$ |
| <i>Apium graveolens</i> | $0,31 \pm 0,04$ | $9,34 \pm 1,25$ |
| <i>Astragalus glycyphyllos</i> | $0,31 \pm 0,01$ | $9,31 \pm 0,46$ |
| <i>Ocimum basilicum</i> | $0,30 \pm 0,04$ | $9,17 \pm 1,12$ |
| <i>Prunus spinosa</i> | $0,29 \pm 0,04$ | $8,76 \pm 1,21$ |
| <i>Capsella bursa-pastoris</i> | $0,22 \pm 0,03$ | $6,69 \pm 0,79$ |

| | | |
|------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Onopordon acanthium</i> | 0,19 ± 0,02 | 5,64 ± 0,45 |
| <i>Urtica dioica</i> | 0,18 ± 0,03 | ,30 ± 0,92 |
| <i>Humulus lupulus</i> | 0,11 ± 0,01 | 3,24 ± 0,45 |
| <i>Valeriana officinalis</i> | 0,07 ± 0,02 | 2,06 ± 0,46 |

* - Референтни растения

Най-високо съдържание на полифеноли беше измерено в екстрактите от *Cotinus coggygia* ($4,65 \pm 0,08$ mmol/L) и *Arctostaphylos uva-ursi* ($4,20 \pm 0,03$), като съдържанието на полифеноли в тях е близо 2 пъти по-високо от това на референтните растения ройбос ($2,35 \pm 0,03$ mmol/L) и мате ($2,20 \pm 0,07$). Други шест вида също показаха съдържание на полифеноли в техните екстракти по-високо от това на ройбос и мате. Това са *Fragaria vesca* ($2,93 \pm 0,06$ mmol/L), *Origanum vulgare* ($2,81 \pm 0,06$ mmol/l), *Melissa officinalis* ($2,80 \pm 0,03$ mmol/L), *Hypericum perforatum* ($2,56 \pm 0,02$), *Rheum officinale* ($2,52 \pm 0,10$), *Cydonia vulgaris* ($2,44 \pm 0,04$). Във водно-етаноловите екстракти от още осем вида бяха установени КП по-високи от тази в екстракта от черен чай.



В резултат на настоящото изследване беше установена много висока корелативна зависимост между АОА и КП в екстрактите ($r=0,92$) (фиг. 1).

Фиг. 1. Корелация между АОА и КП на 40% водно-етанолови екстракти

Обсъждане

От направеното проучване става ясно, че по-голямата част от изследваните български растения са с по-висока или съизмерима АОА и КП на техните екстракти в сравнение с избраните референтни растения. Особено открояващи се по отношение на АОА са екстрактите от листата на смрадлика (*Cotinus coggygia*), мечо грозде (*Arctostaphylos uva-ursi*) и горска ягода (*Fragaria vesca*). Значително по-високо съдържание на полифеноли беше установено в екстрактите от *Cotinus coggygia* и *Arctostaphylos uva-ursi*.

За по-нататъшно проучване на антиоксидантния потенциал бяха подбрани растенията, за които бяха измерени най-високи стойности на АОА и КП на техните екстракти, а именно: *Agrimonia eupatoria*, *Alchemilla vulgaris*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Cotinus coggygia*, *Cydonia vulgaris*, *Fragaria vesca*, *Hypericum perforatum*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Rheum officinale* и *Sambucus ebulus*.

Наличието на корелация между АОА и КП показва, че именно полифенолите са едни от основните съединения в екстрактите, допринасящи за антиоксидантната им активност. Може да се приеме, че 92% от АОА на водноалкохолните екстракти се дължи на съединения с фенолна природа. Други автори също докладват такава зависимост. Моуег и съавтори (2002) установяват корелационна връзка като изследват различни плодове от родовете *Vaccinium*, *Rubus* и *Ribes*. Kalt и съавтори (2001) установяват такава при различни видове *Vaccinium*, а Javanmardi и съавтори (2003) – при изследване на различни находища на босилек (*Ocimum basilicum* L.). Изхождайки от стойността на корелационния коефициент, става ясно че АОА на растителните екстракти се дължи не само и единствено на фенолните съединения, а също така и на други вторични метаболити, притежаващи такава активност, например етерични масла, каротиноиди, витамини и други (Javanmardi et al., 2003).

Настоящото проучване ясно показва, че българските лечебни растения са с много висок антиоксидантен потенциал. Включването на референтни растения в списъка на изследваните даде възможност да направим оценка на това къде се нареждат по отношение на антиоксидантна активност и полифенолно съдържание най-популярните лечебни растения в нашата народна медицина. Вижда се, че повече от половината от изследваните видове са с измерени АОА и съдържание на полифенолни в техните екстракти по-високи или съизмерими с тези на референтните растения. Поради тази причина бе предприето едно по-задълбочено проучване на антиоксидантния потенциал на избрани български лечебни растения.

3. Определяне на антиоксидантна активност на различни видове фракции от избрани растения

Въз основа на резултатите от измерването на АОА и КП на водно-етаноловите екстракти бяха подбрани единадесет вида български лечебни растения, които да бъдат подложени на фракционен анализ. Измежду изследваните растения с най-висока АОА на ТМЕ се отличават *Cotinus coggygia* ($65,47 \pm 0,57$ mmol/L) и *Arctostaphylos uva-ursi* ($63,23 \pm 2,97$ mmol/L), на ПЕФ – *Cydonia vulgaris* ($23,75 \pm 0,1$ mmol/L), на ХФ – *Hypericum perforatum* ($6,51 \pm 0,01$ mmol/L) и *Arctostaphylos uva-ursi*

(6,02±0,4 mmol/L), на ЕАФ *Cotinus coggygia* (132,15±2,48 mmol/L), на БФ *Fragaria vesca* (60,27±0,93 mmol/L) и *Arctostaphylos uva-ursi* (59,91±1,23 mmol/L) и на ВФ *Fragaria vesca* (22,49±0,15 mmol/L).

4. Определяне концентрацията на полифеноли на различни видове фракции от избрани растения

Най-високи стойности на КП на ТМЕ бяха измерени за *Alchemilla vulgaris* (12,26±0,29 mmol/L) и *Cotinus coggygia* (12,14±0,15 mmol/L), на ПЕФ и ХФ за *Rheum officinale* (съответно 2,38±0,05 mmol/L и 2,91±0,04 mmol/L), на ЕАФ за *Cotinus coggygia* (22,14±0,41 mmol/L), на БГ за *Agrimonia eupatoria* (12,02±0,12 mmol/L) и на ВФ за *Melissa officinalis* (6,3±0,11 mmol/L), *Fragaria vesca* (5,63±0,22 mmol/L) и *Origanum vulgare* (5,6±0,31 mmol/L).

Обсъждане

Прилагането на фракционен анализ при изследване на растителни екстракти позволява по-детайлно проучване на фитохимичния състав на растителния материал.

Измерването на АОА на различните видове фракции показва в кои от тях се извличат най-много от веществата с антиоксидантна природа. Същевременно, видът на съответните вещества, който обуславя различна разтворимост в съответните видове фракции, позволи растенията да бъдат групирани в зависимост от съдържанието на антиоксиданти и ПФ. Така за *Agrimonia eupatoria*, *Alchemilla vulgaris*, *Cotinus coggygia*, *Fragaria vesca*, *Rheum officinale*, *Melissa officinalis* и *Sambucus ebulus* най-висока АОА притежава етилацетатната фракция, а за *Cydonia vulgaris*, *Hypericum perforatum* и *Origanum vulgare* – бутаноловата фракция. За *Arctostaphylos uva-ursi* тоталният метанолов екстракт бе с най-висока АОА.

С най-висока концентрация на полифеноли при всички изследвани видове се откроява ЕАФ, последвана от БФ при *Agrimonia eupatoria*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Fragaria vesca*, *Hypericum perforatum*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare* и *Sambucus ebulus* и ТМЕ при *Alchemilla vulgaris*, *Cotinus coggygia*, *Cydonia vulgaris* и *Rheum officinale*.

Изчисляването на степента на корелация между АОА и КП показва много висока зависимост при ЕАФ ($r=0,93$), БФ ($r=0,81$) и при ТМЕ ($r=0,81$). При останалите фракции не беше установена такава зависимост. Стойностите на r при ПЕФ, ХФ и ВФ фракции са съответно $r=0,22$; $r=0,03$, $r=0,34$. Тези резултати показват, че полифенолните съединения присъстват предимно в ТМЕ, ЕА и БФ. Липсата на корелативна връзка при останалите

показва, че измерената, макар и незначителна антиоксидантна активност при тях, най-вероятно се дължи на съединения, различни от фенолните.

5. RP-HPLC анализ на водно-алкохолен екстракт от *Agrimonia eupatoria*

В 40% водно-алкохолен екстракт от *A.eupatoria* беше установено наличието и на четирите, използвани като свидетели, фенолни киселини (галова, канелена, кафеена и хлорогенова киселини). Най-висока концентрация беше установено за галовата киселина (112 µg/ml), докато останалите присъстваха в значително по-ниски концентрации (табл. 5).

Таблица 5. Концентрация на фенолни киселини във водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria*.

| Концентрация | µg/ml екстракт | mg/g растителен материал |
|----------------------|----------------|--------------------------|
| Галова киселина | 112,167 | 4,99 |
| Канелена киселина | 8,884 | 0,39 |
| Кафеена киселина | 3,629 | 0,16 |
| Хлорогенова киселина | 2,691 | 0,12 |

Обсъждане

Въз основа на резултатите от измерването на АОА и КП на водно-етанолови екстракти, както и на различните видове фракции, беше избран един вид растение, чийто екстракт да бъде изследван чрез хроматографски техники и с което да бъдат извършени проучвания относно антиоксидантния потенциал в живи системи, включващи клетъчни култури и експериментални животни. Изборът се спря върху *Agrimonia eupatoria* по няколко съображения. На първо място, от групата на растенията с най-високи стойности за АОА и най-високо съдържание на полифеноли на техните екстракти и фракции *Agrimonia eupatoria* е сравнително най-слабо проучен вид в това направление. Освен това, *Agrimonia eupatoria* е единственият вид, с изключение на *Melissa officinalis*, от селектираната група растения, подложени на фракционен анализ, с приложение в съвременната фитотерапия за лечение и профилактика на диабет (Петков, 1982). Известно е, че диабет, особено тип 2 предшества от затлъстяване и съпровождащите го метаболитни нарушения, се съпътства от нискостепенно възпаление и оксидативен стрес. Литературните данни за фитохимичния състав на *Agrimonia eupatoria* са непълни и се базират на единични съобщения. Настоящото

изследване за първи път установи наличие на галова киселина, канелена киселина и кафеена киселина в екстракт от *Agrimonia eupatoria*. При това галовата киселина бе в изключително висока концентрация, докато останалите фенолни киселини бяха измерени в значително по-ниски концентрации. Установените високи относителни количества галова киселина, както и съобщенията за нейното антиоксидантно действие (Kim, 2007), дават основание да се предположи, че водно-алкохолният екстракт от камшик вероятно би проявил протективно действие в условия на оксидативен стрес при експерименти *in vivo*. Същевременно, в литературата се съобщава за антихипергликемичното действие на кафеената и галовата киселини (Jung et al., 2006; Prasad et al., 2010). Това свойство на галовата киселина, в допълнение на антиоксидантното ѝ действие, би могло да обуслови силен протективен ефект на екстрактите при метаболитни нарушения при затлъстяване и диабет тип 2, съпроводени с оксидативен стрес.

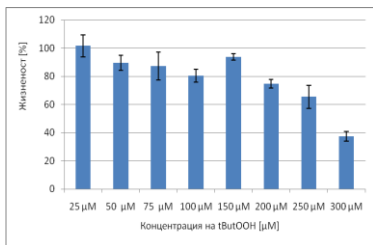
6. Определяне влиянието на t-ButOON върху жизнеността на клетъчни култури

Определяне влиянието на t-ButOON върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити

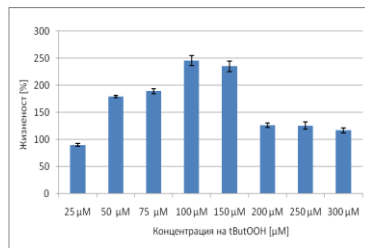
Резултатите от анализа на цитотоксичното действие на различни концентрации на t-ButOON върху 3T3-L1 клетъчна култура са представени на фиг. 2. Установено беше, че жизнеността на клетките намалява с увеличението на концентрацията на приложения върху тях t-ButOON, като при концентрация от 100µM жизнеността все още бе сравнително близо до максималната (~80%). При концентрация на t-ButOON от 300µM клетъчната жизненост рязко спада под 40%.

Определяне влиянието на t-ButOON върху жизнеността на J744A.1 макрофаги

Резултатите от анализа на цитотоксичното действие на различни концентрации на t-ButOON върху J744A.1 клетъчна култура са представени на фиг. 3. За разлика от преадипоцити, при макрофаги нарастващите концентрации на t-ButOON в използвания диапазон имаха първоначално стимулиращ ефект върху клетъчната пролиферация. След достигане на определен максимум (при концентрация на t-ButOON от 100-150µM) жизнеността на клетките рязко спада. При максималната приложена концентрация на оксидативния агент (300µM) жизнеността на клетките все още беше около 100%.



Фиг. 2. Цитотоксичност на *t-ButOON* върху 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна култура



Фиг. 3. Цитотоксичност на *t-ButOON* върху J744A.1 макрофажна клетъчна култура

Обсъждане

За да бъде използван *t-ButOON* като индуктор на оксидативен стрес в различни експерименти с клетъчни култури, счетохме за необходимо предварително да определим неговата минималната цитотоксична концентрация. Такова изследване цели:

1. Да се определи при каква концентрация на агента, с който ще се третират клетките, същите запазват максимална жизненост. Така за последващите експерименти ще бъдат подбрани такива концентрации, които не са токсични за клетките.

2. Да се определи как увеличаването на концентрацията на агента влияе върху клетъчната пролиферация, т. е дали се проявява потискащо или стимулиращо въздействие.

И при двата вида клетъчни линии *t-ButOON* беше приложен в нарастващи концентрации от 25 μM до 300 μM, в продължение на 20 часа. С увеличаване концентрацията на *t-ButOON* се установи намаляване на клетъчната жизненост при 3T3-L1 клетките като при концентрация от 100 μM тя все още е близо до максималната (~80%). При концентрация на *t-ButOON* 300 μM клетъчната жизненост рязко спада до под 40%.

Механизмите, посредством които АКФ и оксидативният стрес могат да инхибират клетъчното делене или да проявят цитотоксичност, са много. Доказано е, например, че оксидативни агенти като H_2O_2 и *t-ButOON* индуцират задържане на клетъчния цикъл във фаза G1 и G2/M при CHO (Chinese hamster ovary) клетки (Clopton & Saltman., 1995). Авторите установяват, че този ефект се дължи на инхибиране активността на E/Cdk2 (циклин E/циклин зависима киназа 2) и B/Cdk2 (циклин B/циклин зависима киназа 2) комплексите. При наличие на клетъчно увреждане и

мутации в ДНК, вследствие действието на АКФ, се активира p53 (Macleod, et al., 1995). Този протеин играе съществена роля за задържане на клетъчния цикъл в G1. Установено е, че t-ButOON силно индуцира p53 в нормални човешки фибробласти (Shackelford et al., 2000). Промени в клетъчния редокс статус могат да активират и други проапоптотични сигнални протеини (Davis, 2000). Оксидативният стрес може да действа и на ниво митохондрии, като повлиява освобождаването на цитохром c (Kim & Lemasters, 2003; Lemasters et al., 2002), което иницира апоптоза. При високостепенен оксидативен стрес необратимо се увреждат важни молекули като протеини, мембранни липиди, нуклеинови киселини, което може да бъде причина за клетъчна смърт.

Приложението на t-ButOON върху J744A.1 макрофаги в настоящия експеримент имаше първоначално стимулиращ ефект върху клетъчната пролиферация. При концентрация на t-ButOON от 50μM жизнеността доближава 200%, а при концентрация от 100μM тя е почти 250%. При концентрация на оксидативния агент от 300μM тя е все още повече от 100%. Вероятно, след определена концентрация, освен процеси, които водят до стимулиране на клетъчната пролиферация, превес започват да имат и процеси на отмиране на клетки. Yoshioka и съавтори (2006) установяват плавно намаление в жизнеността на RAW 264 макрофаги, третирани с H₂O₂ в концентрации от 500μM до 1500μM.

Дали даден оксидативен стимул ще индуцира клетъчната пролиферация или ще прояви цитотоксично действие, зависи от клетъчния тип и от приложените концентрации. В настоящия експеримент се установи, че концентрации на t-ButOON до 100μM силно стимулират пролиферацията на J774A.1 макрофаги, а в същото време не повлияват или са с ниска цитотоксичност за 3T3-L1 преадипоцити. Явно е налице специфичност по отношение на отговора на различните клетъчни типове към стимулиране с t-ButOON.

В много експерименти е установено, че АКФ могат да индуцират клетъчно делене. Някои от сигналните пътища, активиращи клетъчното делене, включват MAP киназните каскади. Установено е, че всички участници в тези MAP каскади имат редокс сензитивни сайтове и прилагането на оксидативни стимулатори като H₂O₂ води до активиране на киназната им активност (Allen & Tresini, 2000). Фосфатазите на MAP киназите дефосфорилират и инактивират MAP киназите. Те имат цистеинов остатък в активния си център, който служи като нуклеофил в каталитичния процес (Tonks, 2005). Неговото окисление променя неуклеофилните му свойства и инхибира активността на ензима (Rhee et al., 2005).

Оксидантът t-ButOON приложен в концентрации до 100 μ M не проявява или проявява слабо цитотоксично действие върху двата използвани типа клетки – преадипоцити и макрофаги (фиг. 2 и фиг. 3). Поради това, за следващите експерименти бяха избрани концентрациите от 50 μ M и 100 μ M, за които се предполага, че индуцират умерен оксидативен стрес, без това да предизвиква клетъчна смърт.

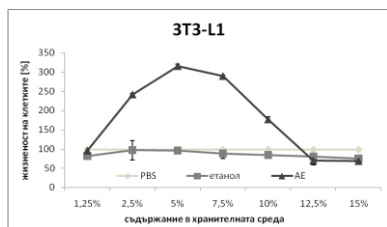
7. Определяне влиянието на АЕ върху жизнеността на клетъчни култури

Определяне влиянието на АЕ върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити

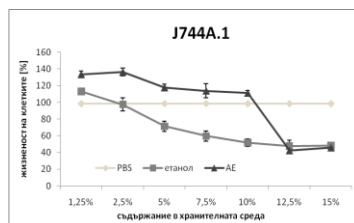
3T3-L1 клетки бяха третирани с АЕ в концентрации от 1,25 до 15%. Прилагането на нарастващи концентрации АЕ имаше първоначално стимулиращ ефект върху клетъчната пролиферация (фиг. 4). Клетъчната жизненост бе максимална при 5% съдържание на АЕ в хранителната среда и достигаше стойности над 300%. При по-високите концентрации от 12,5% и 15% жизнеността пада под тази на контролата (PBS).

Определяне влиянието на АЕ върху жизнеността на J744A.1 макрофаги

J744A.1 клетки бяха третирани с АЕ в концентрации от 1,25 до 15%. При концентрации на екстракт в хранителната среда от 1,25 до 2,5% клетките запазваха максимална жизненост (133% и 136%, съответно) (фиг. 5). При увеличаване концентрацията на АЕ над 2,5% броят на клетките беляза спад, достигайки стойности от 45% жизненост при 15% съдържание на АЕ.



Фиг. 4. Влияние на АЕ върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити.



Фиг. 5. Влияние на АЕ върху жизнеността на J744A.1 макрофаги.

Обсъждане

Преди провеждането на експерименти с третиране на клетъчни култури с АЕ беше необходимо предварително да бъдат избрани подходящи концентрации на екстракта в хранителната среда, при които клетките запазват максимална жизненост.

При изследване влиянието на АЕ върху жизнеността на 3T3-L1 преадипоцити беше установено, че с нарастване на съдържанието на екстракта в диапазона от 1,25% до 5% се наблюдава увеличение на клетъчната жизненост до 315% спрямо контролата. Очевидно е налице активиране на клетъчната пролиферация под въздействие на екстракта. С нарастване на съдържанието на екстракта в хранителната среда над 7,5%, бе наблюдаван прогресивен цитотоксичен ефект върху клетъчната култура, като при максималните приложени концентрации (12,5% и 15%) жизнеността спада под тази на контролата. В същото време контролният на екстракта разтвор на етанол, приложен в същия диапазон на процентно съдържание, имаше слаба нарастваща с концентрацията цитотоксичност. За проучванията на протективното действие на екстракта при индукция на оксидативен стрес върху 3T3-L1 клетки бяха избрани концентрациите на АЕ, при които се измерва максимална жизненост на клетките, и при които не са започнали процеси на клетъчно отмиране, а именно концентрации на АЕ от 2,5% и 5%.

Измерването на клетъчната жизненост след прилагане на АЕ върху J744A.1 макрофаги също показва стимулиращ ефект на по-ниските приложени концентрации. Жизнеността на клетките е максимална при съдържание на АЕ в хранителната среда от 1,25% и 2,5% и е с около по 30% по-висока от тази на нетретираната контрола. При нарастване съдържанието на АЕ в хранителната среда жизнеността започва плавно да намалява, но остава все още по-висока от тази на контролата. При 12,5% и 15% съдържание на АЕ в хранителната среда се установява рязък спад в жизнеността на клетките, до стойности от около 40%. Контролният за екстракта разтвор на етанол имаше цитотоксичен ефект, нарастващ с увеличаване на съдържанието на етанол в хранителната среда. Може да се приеме, че при J774A.1 макрофаги АЕ проявява цитопротективен ефект, тъй като при едно и също съдържание в хранителната среда (в диапазона 1,25%-10%) отчетената жизненост е по-висока при третираните с АЕ клетки, в сравнение с третираните с етанол клетки.

Вероятна причина за наблюдавания стимулиращ ефект на по-ниските концентрации на АЕ в хранителната среда е повлияване на клетъчния растеж от съставки на екстракта. Намаляването на жизнеността след

определени по-високи концентрации на екстракта би могло да се обясни с проява на токсични ефекти на някои компоненти на екстракта върху клетките.

Пролиферативният ефект на екстрактите би могъл да се обясни със способността на някои фенолни съединения да активират MAP сигналните каскади (Kong et al., 2000). Цитотоксичното действие на екстрактите се обяснява със способността на някои фенолни съединения да инхибират клетъчното делене и да индуцират апоптоза. Например, за кверцетин е установено, че може да индуцира апоптоза в 3T3-L1 адипоцити като понижава степента на фосфорилиране на ERK и JNK и модулира медираните от тях сигнални пътища (Ahn et al., 2008); понижава митохондриалния мембранен потенциал и активира каспаза 3 и Bax и Bak протеините и инхибира Bcl-2 (Hsu et al., 2006). Комбинация от кверцетин и резвератрол в концентрация от 100 μ M индуцира апоптоза в 3T3-L1 клетки посредством стимулиране освобождаването на цитохром c от митохондриите към цитозола и намаляване степента на фосфорилиране на ERK 1/2 (Yang et al., 2008).

Дали екстрактът ще прояви цитотоксично действие или ще стимулира клетъчната пролиферация, зависи от клетъчния тип и приложената концентрация. Вероятно ниски концентрации стимулират експресията на гени, свързани с пролиферация, а високи концентрации активират каспазните каскади, инициращи апоптоза (Kong et al., 2000).

8. Влияние на АЕ върху експресията на редокс сензитивни гени

8.1. Влияние на АЕ върху експресията на ензими от обмяната на глутатион

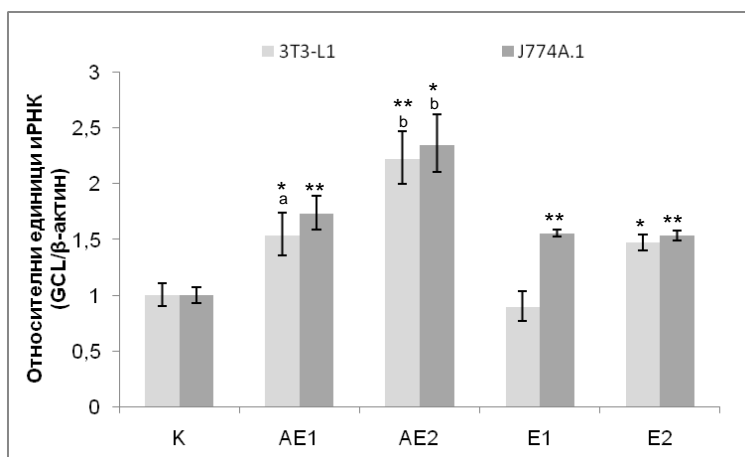
Влияние върху експресията на GCL

Експресия на GCL в нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити

Експресията на скоростоопределящия ензим в *de novo* синтеза на глутатион – γ -глутаматцистеин лигаза (GCL) беше стимулирана в 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна култура от присъствието на АЕ. И двете приложения в продължение на 24 часа концентрации на АЕ предизвикаха значително стимулиране на експресията на GCL (фиг. 6). При клетките третирани с 2,5% АЕ бяха измерени с 50% по-високи нива на иРНК, в сравнение с нетритираната контрола ($p < 0,05$). При клетките третирани с АЕ в концентрация от 5% степента на транскрипция се увеличи повече от 200% ($p < 0,01$). Стимулиращо действие по отношение на транскрипцията на GCL беше отчетено и за етиловия алкохол: Е2 предизвика 47% увеличение на тази експресия ($p < 0,05$).

Експресия на GCL в нестимулирани J774A.1 макрофаги

След прилагането на АЕ върху нестимулирани J774A.1 макрофаги беше отчетен значителен стимулиращ ефект на екстракта върху степента на транскрипция на гена за GCL (фиг. 6). Съдържание на АЕ от 1,25% в хранителната среда повиши нивата на GCL транскриптите с повече от 70% ($p<0,01$), а двукратно по-високата концентрация доведе до стимулиране на генната експресия на този ген с 240% ($p<0,05$). Контролните за екстракта разтвори на етанол в хранителната среда (E1 и E2) също имаха индуциращ ефект върху експресията на GCL в тази клетъчна линия, като предизвикаха съответно 56% и 54% активиране на експресията ($p<0,01$).



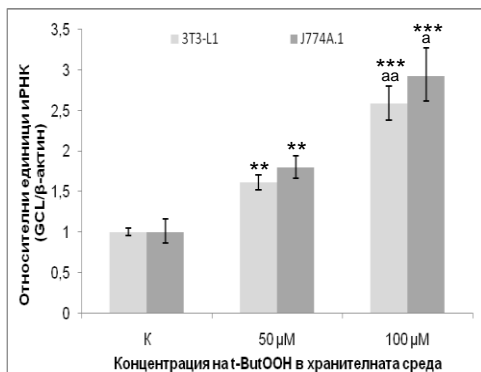
Фиг. 6. Влияние на АЕ върху експресията на GCL в нестимулирани преадипоцити и макрофаги (** $p<0,01$ спрямо K; * $p<0,05$ спрямо K; ^a $p<0,05$ спрямо E1; ^b $p<0,05$ спрямо E2)

Експресия на GCL в оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити

За определяне ефекта на АЕ върху експресията на редокс сензитивни гени в условия на оксидативен стрес беше необходимо предварително да се определи въздействието на оксидативното стимулиране върху тази експресия. Третирането на 3T3-L1 преадипоцити с t-ButOON показва значителен индуциращ ефект върху експресията на изследвания ген (фиг. 7). t-ButOON в концентрация от 50 μM предизвика около 60% стимулиране на нивото на транскрипция ($p<0,01$), а в концентрация от 100 μM доведе до

250% по – високи нива ($p<0,001$). Двукратно по-високата концентрация на оксиданта имаше с около 80% по-силен стимулиращ ефект върху тази експресия ($p<0,01$).

Проследяването на ефекта на АЕ върху експресията на GCL, но в условия на оксидативно стимулиране, беше извършено при претретиране на клетките с АЕ в продължение на 24 часа с последващо прилагане на 100 μ M разтвор на t-ButOON. В претретираните оксидативно стимулирани 3T3-L1 клетки бяха измерени значително по-ниски нива на иРНК, в сравнение с тези, които не са били претретираны с екстракт (фиг. 8). Съдържание на АЕ от 2,5% в културалната среда намали стимулиращия ефект на t-ButOON с 12%, а 5% съдържание на АЕ – с 24% ($p<0,05$). В същото време стойностите на експресия на GCL в претретираните клетки остават по-високи, в сравнение с тези на нетретираната контрола ($p<0,01$ за АЕ1 и $p<0,05$ за АЕ2). Подобен беше ефектът и на контролните етанолови разтвори Е1 и Е2.



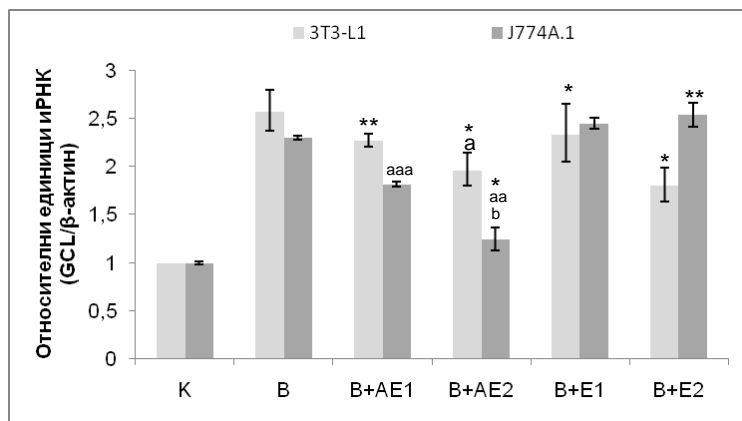
Фиг. 7. Влияние на t-ButOON върху експресията на GCL в преадипоцити и макрофаги
(*** $p<0,001$ спрямо К; ** $p<0,01$ спрямо К; * $p<0,01$ спрямо 50 μ M; * $p<0,05$ спрямо 50 μ M)

Експресия на GCL в оксидативно стимулирани J774A.1 макрофаги

Третирането на J774A.1 макрофаги с t-ButOON предизвика значително увеличение на нивото на генна експресия на GCL (фиг. 7). Оксидативният агент в концентрация 50 μ M стимулира експресията с почти 80% ($p<0,01$), а в концентрация 100 μ M доведе до почти трикратно увеличение на нивата на иРНК за изследвания ген, в сравнение с базисните нива на транскриптите ($p<0,001$). Силата на индукция беше в зависимост от концентрацията на приложени оксидативен стимулатор ($p<0,05$).

Претретирането на J774A.1 макрофаги с АЕ, предшествашо оксидативното стимулиране, доведе до установяване на понижени стойности

на експресия на GCL в тези клетки в сравнение с оксидативно стимулираните и неперетритирани (фиг. 8). АЕ в концентрации от 1,25% и 2,5% значително намали индуцирания ефект на оксидативния стимул с 20% ($p<0,001$) и почти с 50% ($p<0,01$), съответно. Степента на потискане ефекта на оксиданта беше в зависимост от приложената концентрация на АЕ ($p<0,05$).



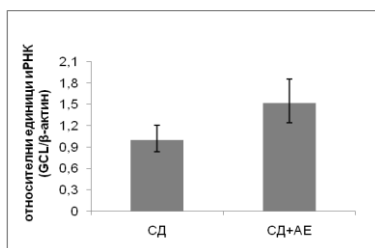
Фиг. 8. Влияние на АЕ върху експресията на GCL при оксидативно стимулирани преадипоцити и макрофаги (***) $p<0,001$ спрямо К; **) $p<0,01$ спрямо К; *) $p<0,05$ спрямо К; ^{aaa}) $p<0,001$ спрямо В; ^{aa}) $p<0,01$ спрямо В; ^a) $p<0,05$ спрямо В; ^b) $p<0,05$ спрямо В+АЕ1)

Експресия на GCL в адипозна тъкан на плъхове на СД

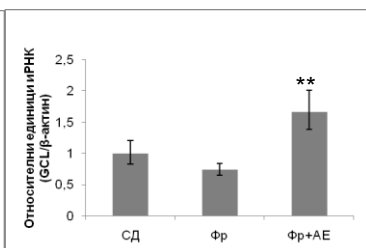
Приемането на АЕ в продължение на 12 седмици доведе до установяване с около 50% по-високи нива на експресия на GCL в адипозна тъкан на животните приеми екстракт, в сравнение с групата на СД (фиг. 9).

Експресия на GCL в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Приемането на АЕ в продължение на 12 седмици от плъхове, обременявани с фруктоза с цел индуциране на метаболитни нарушения, доведе до значително увеличение на нивата на транскрипция на гена за GCL в адипозна тъкан (фиг. 10). При групата на животните на високофруктозна диета, приеми АЕ (Фр+АЕ) беше установено повече от двукратно по-висока степен на транскрипция на ензима, в сравнение групата Фр ($p<0,01$), където не беше установена статистически значителна промяна в нивото на експресия на GCL, в сравнение с нетретирания контрола.



Фиг. 9. Влияние на приема на АЕ върху експресията на GCL в адипозна тъкан на плъхове на СД



Фиг. 10. Влияние на приема на АЕ върху експресията на GCL в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения (**p<0,01 спрямо Фр)

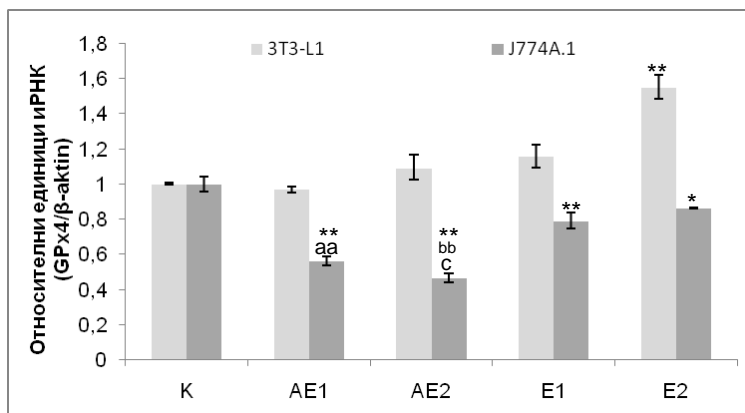
Влияние върху експресията на GPR4

Експресия на GPR4 в нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити

Прилагането на АЕ в концентрации от 2,5% и 5% не повлия експресията на GPR4 в 3T3-L1 преадипоцити (фиг.11). От използваните разтвори за третиране единствено контролният за АЕ2 разтвор на етилов алкохол (Е2) имаше статистически значимо въздействие върху тази транскрипция, като я повиши с 50% (p<0,01).

Експресия на GPR4 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

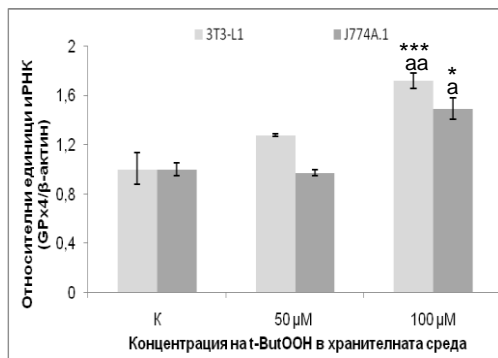
И двете приложени концентрации на АЕ, съответно 1,25% АЕ1 и 2,5% АЕ2 проявиха статистически достоверен инхибиращ ефект върху експресията на GPR4 в J774A.1 макрофаги (фиг. 11). Съдържание на АЕ от 1,25% инхибира експресията с повече от 40% (p<0,01), а съдържание на АЕ от 2,5% - с 54% (p<0,01). Степента на инхибиране беше зависима от концентрацията на АЕ (p<0,05). Контролните разтвори Е1 и Е2 също проявиха инхибиращо действие, съответно с 22% и 14%, спрямо контролата (p<0,01 за Е1 и p<0,05 за Е2).



Фиг. 11. Влияние на АЕ върху експресията на GPx4 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги (**p<0,01 спрямо K; *p<0,05 спрямо K; ^{aa}p<0,01 спрямо E1; ^{bb}p<0,01 спрямо E2; ^cp<0,05 спрямо AE1)

Експресия на GPx4 в оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити

Проведените експерименти за установяване на ефекта на t-ButOON върху експресията на GPx4 в 3T3-L1 преадипоцити показаха статистически значимо стимулиране (фиг. 12), зависимо от концентрацията на оксиданта (p<0,01). t-ButOON в концентрация от 100μM увеличи нивата на иРНК със 70% (p<0,001), докато 50μM разтвор увеличи тези нива с около 30%.



Фиг. 12. Влияние на t-ButOON върху експресията на GPx4 в преадипоцити и макрофаги (**p<0,001 спрямо K; *p<0,05 спрямо K ^{aa}p<0,01 спрямо 50 μM; ^ap<0,05 спрямо 50 μM)

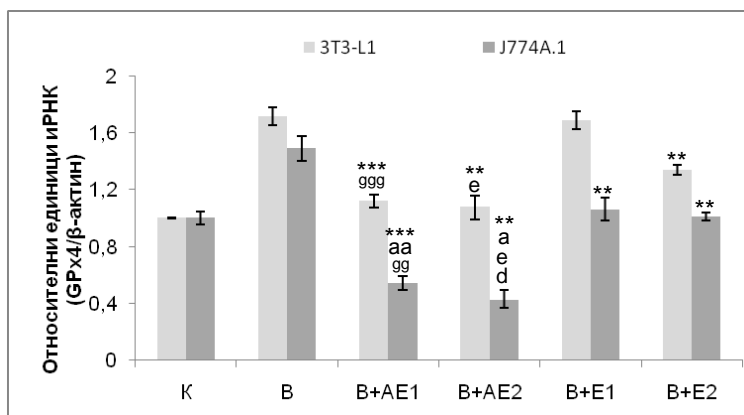
Претретирането на 3T3-L1 преадипоцити с АЕ доведе до установяване на статистически значимо понижаване на нивата на иРНК за GPx4 в

сравнение с тези при оксидативно стимулираните със 100 μ M разтвор на t-ButOОН клетки. И двете приложени концентрации на екстракта редуцираха стимулиращото действие на оксидативния агент с повече от 35% (фиг.13).

Експресия на GPx4 в оксидативно стимулирани J774A.1 макрофаги

Стимулиране на J774A.1 макрофаги с t-ButOОН завиши транскрипционни нива на гена за GPx4 (фиг. 12). Оксидативното стимулиране със 100 μ M t-ButOОН увеличи транскрипцията с около 50% ($p<0,05$). По-ниската концентрация (50 μ M) не повлия експресията в тези клетки.

Измереното относително ниво на експресия на GPx4 след претретиране на клетките с АЕ беше значително по-ниско, в сравнение с това при оксидативно стимулираните клетки (фиг. 13). АЕ в концентрация от 1,25% намали нивото на транскрипция в претретираните клетки с 64% ($p<0,001$), а 2,5% АЕ понижи тази експресия с повече от 70% ($p<0,01$) в сравнение с оксидативно стимулираните клетки. При клетките претретиран с Е1 и Е2, контролни за екстракта, също бяха установени с около 30% ($p<0,01$) по-ниски нива на транскрипция на GPx4, в сравнение с оксидативно стимулираните клетки.



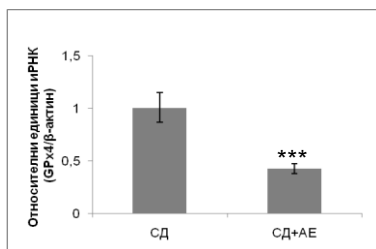
Фиг. 13. Влияние на АЕ върху експресията на GPx4 в оксидативно стимулирани преадипоцити и макрофаги (^{***} $p<0,001$ спрямо В; ^{**} $p<0,01$ спрямо В; ^a $p<0,05$ спрямо К; ^{aa} $p<0,01$ спрямо К; ^{bb} $p<0,01$ спрямо АЕ1; ^c $p<0,05$ спрямо АЕ2; ^d $p<0,05$ спрямо В+АЕ1; ^{sss} $p<0,001$ спрямо В+Е1; ^{ss} $p<0,01$ спрямо В+Е1; ^e $p<0,05$ спрямо В+Е2)

Експресия на GPx4 в адипозна тъкан на плъхове на СД

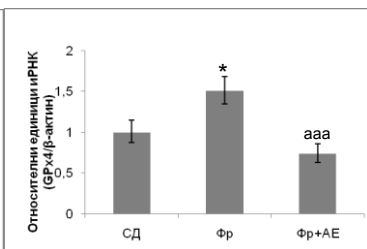
Приемането на АЕ в продължение на 12 седмици доведе до около 60% по-ниски нива на експресия на GPx4 в адипозна тъкан в сравнение с контролната група ($p < 0,001$) (фиг. 14).

Експресия на GPx4 в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Фруктозно натоварване в продължение на 12 седмици доведе до увеличаване на степента на експресия на GPx4 в адипозна тъкан с около 50% ($p < 0,05$) спрямо СД. Фруктозна диета с едновременен прием на АЕ намали значително стимулиращия ефект върху експресията. В група Фр+АЕ бяха отчетени с 50% по-ниски нива на транскрипция на GPx4 ($p < 0,001$), в сравнение с група Фр (фиг. 15).



Фиг. 14. Влияние на АЕ върху експресията на GPx4 в адипозна тъкан на плъхове на СД (***) $p < 0,001$ спрямо СД)



Фиг. 15. Влияние на АЕ върху експресията на GPx4 в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения (* $p < 0,05$ спрямо СД; aaa $p < 0,05$ спрямо Фр)

Обсъждане

Много автори съобщават за промяна в експресията на ензимите, участващи в антиоксидантната защита вследствие на третиране с оксидативни агенти. Kobayashi и съавтори (2009) установяват в 3T3-L1 адипоцити увеличени нива на иРНК за GCL при третиране с H_2O_2 . Те измерват също така и понижение в транскрипцията на GPx4 и смятат, че промените в степента на експресия на тези два ензима имат за цел увеличение на вътреклетъчните концентрации на GSH при стресови

състояния. Zhang и съавтори (2005) провеждат майкроарей анализ на експресията след третиране на RAW264.7 макрофаги с H_2O_2 и установяват стимулирана транскрипция на множество гени, свързани с клетъчния отговор към стрес и преживяването на клетката.

Резултатите от настоящите експерименти показват, че t-ButOON приложен в концентрации от 50 μ M и 100 μ M оказва стимулиращо действие върху експресията на GCL в 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги, като 100 μ M разтвор на съединението предизвиква съответно повече от 2,5 и 3 пъти повишение на транскрипционните нива и зависимостта на силата на индукция на експресията от концентрацията на оксидативния агент беше статистически достоверна. Измерването на нивата на иРНК за GPx4 за двата типа клетки показва, че приложеният оксидативен агент има концентрационно зависимо стимулиращо действие върху тази синтеза.

GCL е изграден от две субединици - каталитична и регулаторна, като каталитичната субединица се регулира на транскрипционно и посттранскрипционно ниво (Lu, 1999). Транскрипционният контрол се опосредства от няколко респонсни елементи в промотора на гена за регулаторната субединица – места за свързване на транскрипционния фактор AP-1, четири ARE/EpRE елементи, едно свързващо място за NF-kB и XRE (Mulcahy et al., 1997; Myhrstad et al., 2002). ARE/EpRE се откриват в промоторите и на други гени, които участват в антиоксидантната защита и обезвреждането на токсични агенти (Favreau & Pickett, 1991). В тези участващи асоциират Nrf1 и Nrf2, в неактивно състояние свързани с Keap1 в цитозола. Дисоциацията на Nrf1/Keap1 комплекса ги освобождава, в резултат на което образуват хетеродимери с други белтъци и преминават в ядрото, където се свързват със съответните регулаторни участващи в промоторите.

Значително по-малко е известно за регулацията на експресията на GPx4. Като цяло се предполага, че GPx ензимите също се индуцират от наличието на оксиданти. Banning и съавтори (2005) установяват, че гастроинтестиналната изоформа на GPx2 (GI-GPx2) се контролира от ARE/EpRE, а активността на промотора зависи от системата Nrf2/Keap1.

Активността на споменатите респонсни елементи се регулира от изменения в редокс баланса в клетката. Модифицирането на генната експресия вследствие на променен редокс статус най-вероятно е медирано от сулфхидрилни групи (Abate et al., 1990; Hecht & Zick., 1992; Meyer et al., 1994). Локални изменения в редокс състоянието на ключови SH групи водят до конформационни промени, което в зависимост от функциите на протеина може да има различен резултат: промяна в свързването с ДНК; дисоциация от инхибиращи или секвестриращи протеини; формиране на

протеинови комплекси, промяна в степента на фосфорилиране (Morel & Barouki, 1999).

Идентифицирани са повече от няколко десетки гени, чиято транскрипция се повлиява от редокс баланса в клетката (Allen & Tresini, 2000). Установено е, че главно значение за тази регулация има съотношението GSH:GSSG (Rahman, 2005). Глутатионовата система служи като клетъчен редокс буфер и промени в GSH:GSSG баланса могат да доведат до окисление на редокс сензитивни цистеинови остатъци в различни белтъци (Rahman, 2005). Всички ензими от метаболизма на глутатион работят интегрирано, което позволява адаптация на клетката към различни стресови състояния (Hayes & Pulford, 1995), като *de novo* синтезът на глутатион е най-важният механизъм, осигуряващ увеличение на нивата на редуциран GSH в отговор на оксидативен стрес (Rahman, 2005). Тъй като промени в активността на GCL са съпроводени от промени в нивата на GSH, то се предполага, че регулацията на GCL е особено важна за поддържането на тези нива (Morales et al., 1997).

От гледна точка на тези факти, установеното в резултат на настоящите експерименти активиране на транскрипцията на GCL от t-ButOON е обяснимо. Оксидативният агент най-вероятно е подложен на реакции на обезвреждане от GPx4 и тъй като този ензим консумира GSH, то нивата на GSH и съответно съотношението GSH:GSSG намаляват. Изместването на този баланс при оксидативен стрес ще доведе до окисление на редокс сензитивни сулфхидрилни групи, например в Keap1, с последващо освобождаване на Nrf1 и Nrf2 и тяхната миграция в клетъчното ядро, където те оказват активиращо действие върху GCL и други редокс сензитивни гени. В резултат на това ще се увеличи нивото на редуциран глутатион в отговор на променените потребности на клетката. Индуциране на експресията на GCL в условия на оксидативен стрес е установена и от други автори (Krzywanski et al., 2004).

Нормално е наличието на оксидативен стимул да индуцира експресията както на GCL, така и на GPx4. В такава ситуация от една страна има увеличена концентрация на пероксиди и очакваният клетъчен отговор ще бъде стимулиране процесите на тяхното обезвреждане, в т.ч. увеличена експресия на GPx4, каквато се установява в настоящия експеримент. От друга страна, активирането на GPx4 консумира GSH. В отговор на това се активират регулаторните системи за възстановяване на GSH:GSSG баланс в полза на първия, в резултат на което се стимулира експресията на регулаторния ензим от синтеза на глутатион – GCL.

От представените резултати се вижда, че експресията на GPx4, в сравнение с този на GCL се повлиява по-слабо от третиране с t-ButOON.

Това може да се дължи на факта, че времето на третиране и използваната концентрация на t-ButOON не изискват значително увеличение на нивата на този ензим, тъй като той не се променя в края на реакцията.

Измерването на нивото на генна експресия показва, че прилагането на екстракт от *Agrimonia eupatoria* върху нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги има индуциращ ефект върху транскрипцията на GCL. Отчетен беше и слаб стимулиращ ефект на етиловия алкохол върху тази експресия, вероятно поради индуцирана продукция на АКФ (Коор, 2006). Между индуциращата сила на разтворите на етанол и екстрактите, обаче, беше установена значителна разлика в полза на екстракта. Измереното индуциране на транскрипцията на GCL от АЕ може да се обясни с наличието на фенолни съединения в екстракта, които притежават способността да индуцират тази експресия. Myhrstad и съавтори (2002) описват такава активност например за кверцетин и откриват, че тази индукция е ARE/EpRE опосредствана. В експерименти с третиране с кверцетин на COS-1 и HepG2 клетки, те измерват увеличение на нивата на иРНК както за регулаторната, така и за каталитичната субединица на ензима. Кверцетин може да индуцира ARE/EpRE медирана експресия и на други редокс сензитивни гени (Valerio et al., 2001; Yao et al., 2007).

Вероятният механизъм, посредством който флавоноидите могат да проявят ARE/EpRE-опосредствано активиране на транскрипцията, е модифициране на взаимодействието между Keap1 и Nrf1 и Nrf2, освобождаване на транскрипционните фактори и транслокацията им в ядрото. Няколко са хипотезите за механизма на това действие. Те се основават на способността на флавоноидите да се свързват с тиолните групи (Galati et al., 2001), с участието им в реакции на автоокисление и образуване на флавоноидни радикали, и вероятна продукция на H_2O_2 и супероксиден анион в тяхно присъствие (Kessler et al., 2003), продукция на H_2O_2 в резултат на техния метаболизъм чрез цитохром P450 монооксигеназната система, изчерпване на GSH в реакции на конюгация на полифеноли при метаболизирането им с участието на ензими от фаза II за обезвреждане на ксеноботици (Hong & Mitchell, 2006). Всички тези хипотези се основават на намаление на съотношението GSH:GSSH, последваща промяна в редокс състоянието на ключови тиолни групи и повлияване активността на транскрипционните фактори, регулиращи експресията на GCL.

Докато експресията на GCL в нестимулирани преадипоцити и макрофаги се повлиява положително както от наличието на оксидативен агент, t-ButOON, така и от съединения, съдържащи се в АЕ, то претретирането на клетките с АЕ намали стимулиращото действие на

оксидативния агент. При преадипоцити, обаче, такова действие имаше и етиловият алкохол, докато при макрофаги това действие може да се отдаде на съдържащи се в растението съставки. Полученият резултат може да бъде обяснен с *in vitro* доказаните антиоксидантни свойства на екстракта. Най-вероятно при наличие на оксидативен агент антиоксидантите от АЕ преимуществено вземат участие в реакции на обезвреждането му, вследствие на което неговата концентрация и съответно стимулиращият ефект върху транскрипцията на гена за GCL намаляват.

Настоящите експерименти показаха, че АЕ проявява инхибиращо действие върху степента на експресия на GPx4 в нестимулирани J774A.1 макрофаги, като проявеният ефект беше в зависимост от концентрацията на екстракта. В 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна култура не беше установено повлияване на експресията на този ензим от АЕ. Това може да предполага наличието на специфичност по отношение на отговора на клетките. Ако се допусне, че експресионният контрол на GCL и GPx4 е сходен, то установеното инхибиране на транскрипцията на GPx4 от АЕ е неочаквано. Такъв ефект, обаче, е описан за някои фенолни съединения и други видове антиоксиданти. Röhrdanz и съавтори (2003) установяват, че кверцетин понижава нивата на иРНК за GPx в хепатомни H4IIE клетки от плъх. Култивирането на HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) в присъствието на α -токоферол води до понижение в нивата на иРНК за GPx4 (Sneddon et al., 2003). Установеният инхибиращ ефект на АЕ върху експресията на GPx4 може да се обясни по-скоро с антиоксидантни свойства на екстракта. Като обезвреждат АКФ, продуцирани при нормалния метаболизъм на клетките, фенолните съединения намаляват необходимостта от действието на GPx4, в резултат на което се отчита понижение в експресията на този ензим, в сравнение с базовите нива (нетретрираната контрола).

Претретрирането на 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги с АЕ доведе до намаляване на стимулиращия ефект на оксиданта върху експресията на GPx4. При преадипоцити претретрирането с АЕ възстановява нивото на транскрипция до базовото. При макрофаги нивата на експресия на GPx4 в претретрираните клетки са по-ниски от тези и на нетретрираната контрола. Както при нестимулираните клетки, така и в експериментите с претретриране и последваща оксидативно стимулиране с t-ButOON, би могло да се преположи, че се проявява антиоксидантна активност на екстракта. Фенолните съединения встъпват в реакции на обезвреждане на оксиданта, а също и на генерирани в негово присъствие АКФ, и с това понижават необходимостта от увеличаване на нивата на GPx4.

При прилагане на АЕ при плъхове на стандартна диета беше отчетено 50% увеличение на експресията на GCL в адипозна тъкан, в сравнение с контролната група. Вероятно механизмът на активиране на транскрипцията

на GCL от АЕ, е аналогичен на този при нестимулирани преадипоцити и макрофаги. Транскрипцията на GPx4, обаче, беше значително намалена (повече от 60% спрямо контролната група). В литературата се посочва предимно стимулиращо действие на фенолните съединения върху експресията на GPx4 в модели *in vivo*. Повечето данни са за повлияване от различни екстракти на експресията на този ензим в черен дроб (Özen & Korkmaz, 2003; Subudhi & Chainy, 2010), миокард (Yeh et al., 2009) и мозък (Sánchez-Reus et al., 2007). Тези различия могат да бъдат обяснени с тъканната специфичност по отношение на отговора към действието на тези съединения. По-голяма част от Цит Р450 ензимите, отговорни за метаболизма на полифенолите (Dinkova-Kostova et al., 2001), се откриват в черен дроб. Известно е, че в резултат на реакциите, катализирани от тези ензими, се генерират АКФ. Следователно, при усилен вътреклетъчен метаболизъм на полифеноли възниква оксидативен стимул, който може да бъде причина за увеличаване експресия на GPx4 в черен дроб. Измереното в настоящия експеримент намаление на експресията на GPx4 в адипозна тъкан вследствие приемането на АЕ може да се обясни с проявата по-скоро на антиоксидантни свойства на екстракта, подобно на действието при клетъчните култури.

Измерването на експресията на GCL в адипозна тъкан на плъхове с фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения установи значително по-високи нива на експресия, в групата приемала екстракт, в сравнение с групата, приемала само фруктозен сироп. В същото време в групата на фруктозо-обогатена диета не бяха установени значителни разлики в експресията на GCL в сравнение с контролната група животни на стандартна диета. Вероятните механизми, посредством които съединения от екстракта могат да стимулират тази експресия, бяха обсъдени по-горе.

Степента на експресия на GPx4 беше значително увеличена в адипозна тъкан на плъхове на фруктозо-обогатена диета. Известно е, че метаболизмът на фруктоза е особено интензивен в адипозна тъкан (Froesh & Ginsberg, 1962) и тъй като той е свързан с генериране на АКФ (Bose & Chakraborti, 2008), то е логично да се установи увеличена експресия на GPx4 в адипозна тъкан на плъхове при такава диета. За други форми на GPx (GPx3) при подобни нарушения (затлъстяване), обаче, други автори установяват понижаване в експресията на ензима, като обясняват това с изчерпана антиоксидантна защита (Lee et al., 2008). Възможно е експресията на различните изоформи на ензима да се повлиява по различен начин. Приемът на екстракт от *Agrimonia eupatoria* в експеримента с фруктозно натоваване доведе до значително понижаване (50%) на стимулиращия ефект на фруктозата върху експресията на GPx4 в

адипозна тъкан ($p < 0,001$). Получените резултати също могат да бъдат обяснени с антиоксидантните свойства на съединения в екстракта.

При анализа на резултатите ключов е въпросът на какво се дължи ефектът на АЕ върху експресията на GCL и GPx4. Ако се допусне, че съединения от екстракта проявяват антиоксидантни свойства *in vivo*, то инхибирането на експресията на GPx4 от АЕ както в клетъчни култури при обичайни условия и при оксидативно стимулиране, така и в адипозна тъкан на плъхове на нормална диета и при фруктозно обременяване, е обяснимо. Обезвреждането на АКФ от антиоксидантите в екстракта намалява активността от антиоксидантни ензими, например GPx4. Но тогава в присъствие на антиоксиданти от екстракта, би следвало да се понижи също и експресията на GCL. В настоящото изследване се получава точно противоположен ефект, а именно – увеличена експресия на GCL вследствие прилагането на АЕ при нестимулирани клетки и в адипозна тъкан на плъхове на нормална диета и в условия на фруктозно обременяване. Много е вероятно от всички изброени по-горе механизми на стимулиране експресията на GCL от АЕ най-съществено значение да има този, при който има директно изчерпване на редуциран глутатион в процесите на глутатионилиране на фенолни съединения от екстракта с участието на ензими от фаза II на обезвреждане на ксенобиотици. Освен това в промотора на GCL има и други респонсни елементи, включително XRE, който се активира от фенолни съединения (Pastore et al., 2003), и опосредства експресията на ензими от фази I и II на клетъчната защита срещу ксенобиотици. При директното консумиране на GSH вероятно се активират сигнални пътища на *de novo* синтез на глутатион, което има за резултат установяване на увеличена експресия на GCL.

Очевидно е, че изясняването на точните механизми, посредством които полифенолите и растителните екстракти могат да повлияят експресията на GCL, изисква допълнително проучване.

8.2. Влияние на АЕ върху експресията на провъзпалителни фактори

Влияние върху експресията на MCP-1

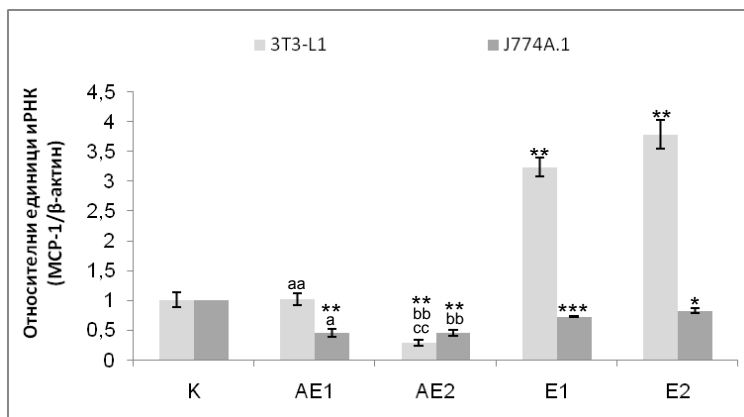
Експресия на MCP-1 в нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити

Установен бе значителен инхибиращ ефект на АЕ върху експресията на MCP-1 в нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити (фиг. 16). Съдържание на екстракт от 5% намали нивата на иРНК с повече от 70% в сравнение с нетретираната контрола ($p < 0,01$), докато по-ниската концентрация на АЕ

не оказва такова въздействие. E1 и E2 стимулираха значително експресията на MCP-1 в тези клетки, съответно с 330% и с 370% ($p<0,01$).

Експресия на MCP-1 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

Степента на експресия на MCP-1 в нестимулирани J774A.1 макрофаги беше значително редуцирана от прилагането на АЕ (фиг. 16). И двете концентрации на екстракта намалиха експресията на белтъка с повече от 50%, сравнено с базисните нива ($p<0,01$), като ефектът не беше в зависимост от концентрацията на АЕ. E1 и E2 също инхибираха експресията с 28% и с 19%, съответно ($p<0,001$ за E1 и $p<0,05$ за E2) спрямо нетретираната контрола.



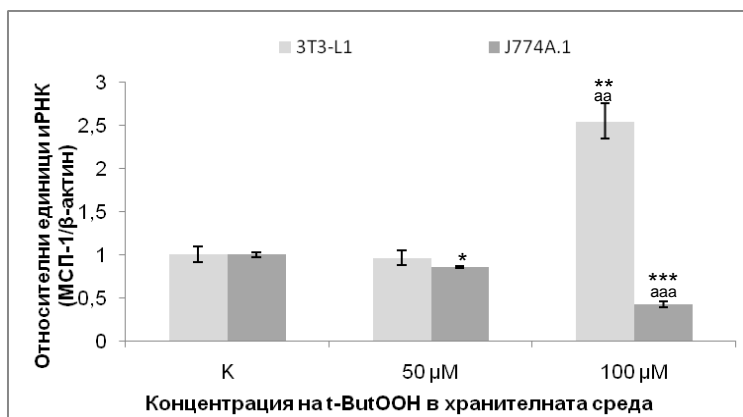
Фиг. 16. Влияние на АЕ върху експресията на MCP-1 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги (* $p<0,05$ спрямо K; ** $p<0,01$ спрямо K; *** $p<0,001$ спрямо K; aa $p<0,01$ спрямо E1; a $p<0,05$ спрямо E1; bb $p<0,01$ спрямо E2; cc $p<0,01$ спрямо AE1)

Експресия на MCP-1 в оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити

Прилагане на t-ButOОН върху преадипоцитна клетъчна култура показва значителен стимулиращ ефект върху експресията на MCP-1 (фиг 17). Оксидативният агент в концентрация от 100 μ M индуцира транскрипцията 2,5 пъти ($p<0,01$), докато 50 μ M от него не предизвикаха промени в експресията.

Проследяването на ефекта на АЕ върху експресията на MCP-1 в условия на оксидативно стимулиране беше извършено при претретиране

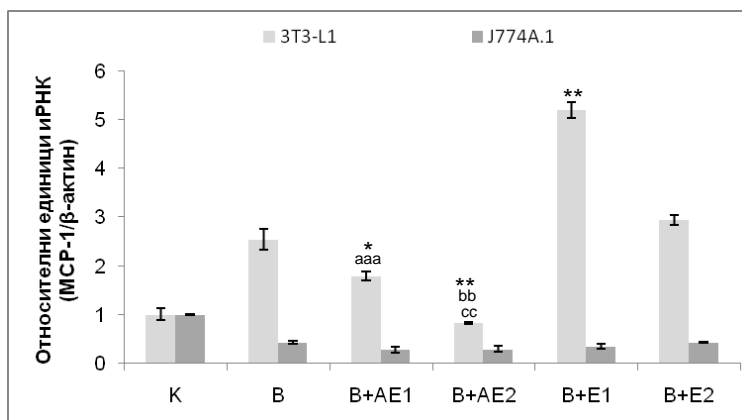
на клетките с АЕ с последващо прилагане на 100 μM разтвор на t-ButOON. В претретираните, оксидативно стимулирани 3T3-L1 клетки бяха измерени значително по-ниски нива на иРНК, в сравнение с тези, които не са били претретираны (фиг. 18). Съдържание на АЕ от 2,5% намали стимулиращия ефект на t-ButOON с 30%, а 5% съдържание на АЕ – с почти 70% ($p<0,05$ и $p<0,01$, съответно). Намалението на индуциращия ефект на оксиданта от екстракта беше в зависимост от концентрацията ($p<0,01$). В същото време, контролните етанолови разтвори допълнително увеличиха експресията на MCP-1 в оксидативно стимулираните клетки.



Фиг. 17. Влияние на t-ButOON върху експресията на MCP-1 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги (** $p<0,001$ спрямо К; ** $p<0,01$ спрямо К; * $p<0,05$ спрямо К; $^{aaa}p<0,001$ спрямо 50 μM ; $^{aa}p<0,001$ спрямо 50 μM)

Експресия на MCP-1 в оксидативно стимулирани J774A.1 макрофаги

Стимулиране на J774A.1 макрофаги с t-ButOON доведе до значително понижаване в транскрипционните нива на MCP-1 (фиг. 17). Степента на инхибиране на синтеза на иРНК беше в зависимост от концентрацията на оксиданта ($p<0,001$): концентрация от 50 μM инхибира транскрипцията с почти 15% ($p<0,05$), а двойно по-висока – с почти 60% ($p<0,001$), в сравнение с нетретираната контрола. След претретиране на J774A.1 макрофаги с АЕ и последваща индукция със 100 μM t-ButOON бяха измерени занижени нива на транскрипция на MCP-1, в сравнение с оксидативно третираните клетки (фиг. 18). Същият ефект имаше и приложението на E1 и E2.



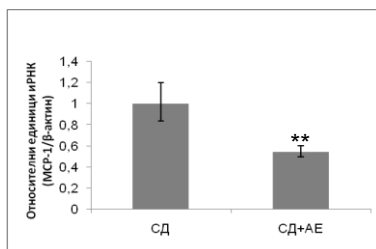
Фиг. 18. Влияние на АЕ върху експресията на MCP-1 в оксидативно стимулирани преадипоцити и макрофаги (* $p < 0,05$ спрямо В; ** $p < 0,01$ спрямо В; ^{aaa} $p < 0,001$ спрямо В+Е1; ^{bbb} $p < 0,001$ спрямо В+Е2; ^c $p < 0,01$ спрямо В+Е1)

Експресия на MCP-1 в адипозна тъкан на плъхове на СД

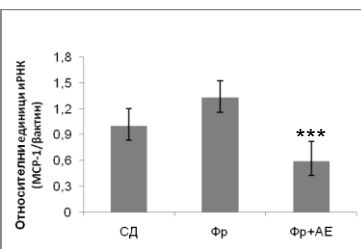
Приемането на АЕ в продължение на 12 седмици доведе до около 50% понижение в степента на експресия на MCP-1 в адипозна тъкан, в сравнение с животните на СД ($p < 0,01$) (фиг. 19).

Експресия на MCP-1 в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Обременяването в продължение на 12 седмици с 12,5% разтвор на фруктоза на плъховете доведе до увеличаване на иРНК транскриптите за MCP-1 с около 30%, в сравнение с животните на СД. Обременяването с фруктоза, съпроводено с прием на АЕ, намали значително (с около 50%) ($p < 0,001$) нивата на транскрипция на гена, в сравнение с групата Фр (фиг. 20).



Фиг. 19. Влияние на приема на АЕ върху експресията на MCP-1 в адипозна тъкан на плъхове на СД (** $p < 0,01$ спрямо СД)



Фиг. 20. Влияние на АЕ върху експресията на MCP-1 в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения (** $p < 0,001$ спрямо Фр)

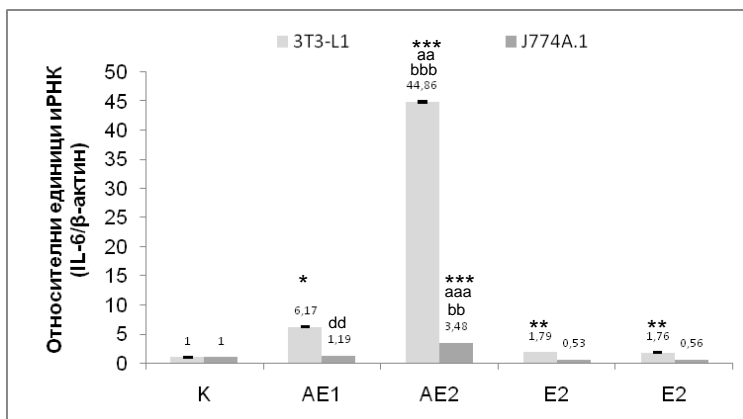
Влияние върху експресията на IL-6

Експресия на IL-6 в нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити

Прилагането на АЕ върху нестимулирани 3T3-L1 преадипоцити доведе до измерване на значително увеличени нива на експресия на IL-6 (фиг. 21). Съдържание на АЕ от 2,5% увеличи нивото на транскрипция 6 пъти ($p < 0,05$), а съдържание на АЕ 5% – повече от 40 пъти ($p < 0,001$). Зависимостта на стимулирането на синтеза на иРНК от концентрацията на екстракта беше значителна ($p < 0,01$). По-слаб, но статистически достоверен стимулиращ ефект върху тази експресия, имаха и E1 и E2. Те увеличиха експресията с около 70%, в сравнение с нетретираната контрола ($p < 0,01$).

Експресия на IL-6 в нестимулирани J774A.1 макрофаги

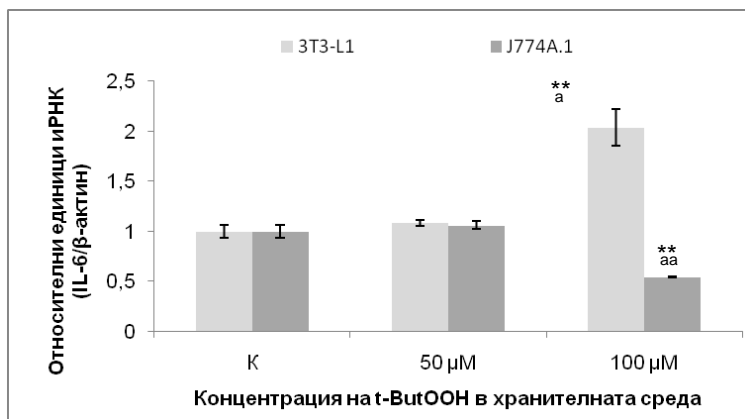
Степента на експресия на IL-6 в J774A.1 макрофаги беше значително стимулирана от наличието на екстракт в хранителната среда (фиг. 21). 2,5% съдържание на АЕ доведе до 3,5-кратно увеличение на експресията на този цитокин ($p < 0,001$). Очевиден е концентрационно зависимият ефект върху транскрипцията ($p < 0,001$). В същото време етиловият алкохол имаше инхибиращ ефект върху транскрипцията, като E1 и E2 намалиха експресията на гена почти наполовина, в сравнение с нетретираната контрола ($p < 0,01$ за E1 и $p < 0,05$ за E2).



Фиг. 21. Влияние на АЕ върху експресията на IL-6 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги (*** $p < 0,001$ спрямо К; ** $p < 0,01$ спрямо К; * $p < 0,05$ спрямо К; ^{aaa} $p < 0,001$ спрямо AE1; ^{aa} $p < 0,01$ спрямо AE1; ^{dd} $p < 0,01$ спрямо E1; ^d $p < 0,05$ спрямо E1; ^{bbb} $p < 0,01$ спрямо E2; ^{bb} $p < 0,01$ спрямо E2)

Експресия на IL-6 в оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити

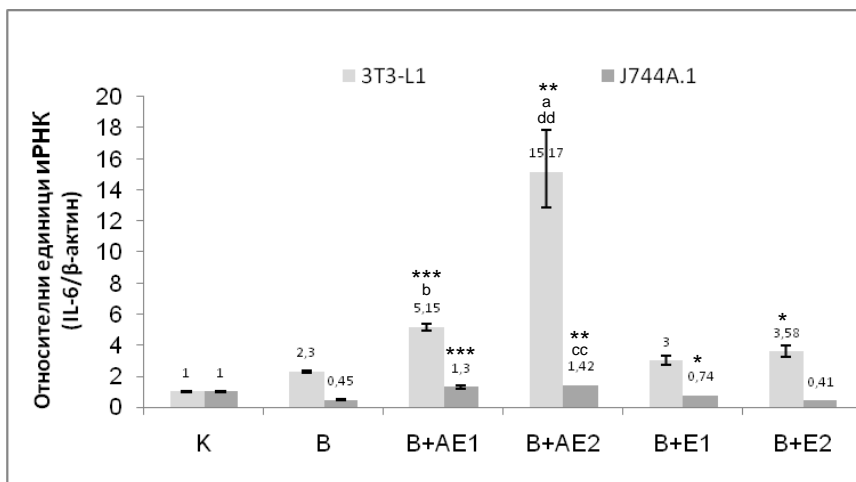
Беше установено стимулиращо действие на t-ButOON върху експресията на IL-6 в 3T3-L1 преадипоцити (фиг 22). Докато 50μM разтвор на оксиданта не прояви забележим ефект върху транскрипцията на гена, то 100 μM разтвор доведе до активирането и над 2 пъти над базисните нива ($p < 0,01$). Прилагането на АЕ за 24 часа с последващо оксидативно стимулиране доведе до измърване на значително по-високи стойности на експресия за IL-6 в претретираните клетки, в сравнение с оксидативно стимулираните (фиг. 23.) Оксидативното третиране понижи стимулиращия ефект на АЕ. При клетките, претретираните с АЕ в концентрация от 2,5%, експресията на изследвания ген бе 2,5 пъти по-висока от тази в клетките, третирани само с t-ButOON ($p < 0,001$). При двойно по-високата концентрация на АЕ стойността на експресия бе 6,5 пъти по-висока, в сравнение с оксидативно стимулираните клетки ($p < 0,01$). Прилагането на E1 и E2 допълнително увеличи експресията на IL-6 в оксидативно стимулираните клетки, съответно с 30% и 55%, спрямо В.



Фиг. 22. Влияние на *t-ButOON* върху експресията на *IL-6* преадипоцити и макрофаги (** $p < 0,01$ спрямо К; ^{aa} $p < 0,01$ спрямо 50μM; ^a $p < 0,05$ спрямо 50μM)

Експресия на IL-6 в оксидативно стимулирани J774A.1 макрофаги

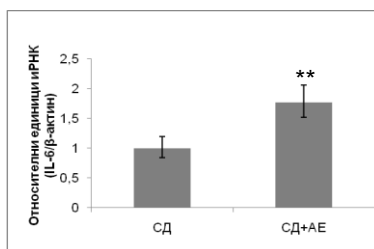
Оксидативното стимулиране на J774A.1 макрофаги имаше инхибиращ ефект върху експресията на *IL-6* (фиг. 22). Оксидантът в концентрация от 100μM понижи степента на транскрипция наполовина, сравнено с контролата ($p < 0,01$). Претретирането на клетките с АЕ неутрализира инхибиращия ефект на оксидативния агент (фиг. 23). При концентрация от 2,5% на АЕ нивото на транскрипция надвишава това на оксидативно стимулираните клетки с 300% ($p < 0,01$), а на нетретираната контрола – с 40% ($p < 0,01$).



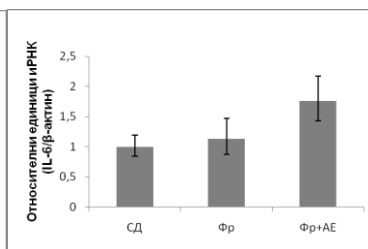
Фиг. 23. Влияние на АЕ върху експресията на IL-6 в оксидативно стимулирани преадипоцити макрофаги (** $p < 0,001$ спрямо В; ** $p < 0,01$ спрямо В; * $p < 0,05$ спрямо В; ^a $p < 0,05$ спрямо В+AE1; ^b $p < 0,05$ спрямо В+E1; ^{dd} $p < 0,01$ спрямо В+E2; ^{cc} $p < 0,01$ спрямо К)

Експресия на IL-6 в адипозна тъкан на плъхове на СД

Приемът на АЕ доведе до значително увеличение на експресията на IL-6 в адипозна тъкан на плъхове на СД с 80%, в сравнение с контролната група ($p < 0,05$) (фиг. 24).



Фиг. 24. Влияние на приема на АЕ върху експресията на IL-6 в адипозна тъкан на плъхове на СД (** $p < 0,01$ спрямо СД)



Фиг. 25. Влияние на приема на АЕ върху експресията на IL-6 в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Експресия на IL-6 в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения

Обременяването с фруктоза не доведе до увеличаване на нивото на иРНК за IL-6 в адипозна тъкан на плъхове, в сравнение с контролната група на СД. Едновременно приемане на АЕ при фруктозно натоварване доведе до увеличаване на нивата на транскриптите с около 60%, в сравнение с група Фр и с около 75%, в сравнение с контролната група на СД (фиг. 25).

Обсъждане

Оксидантът имаше стимулиращ ефект върху експресията на проинфламаторните фактори MCP-1 и IL-6 в 3T3-L1 преадипоцитна клетъчна култура. Въздействието на оксидативния агент в концентрация от 100μМ повиши двукратно нивата на иРНК за IL-6 и 2,5 пъти – тези на MCP-1, в сравнение с нетретираната контрола. Подобни резултати за индукция от оксидант докладват и други автори (Chen et al, 2009).

При J774A.1 макрофаги повлияването на експресията на MCP-1 и IL-6 от t-ButOОН беше различно от очакваното. При тях въздействието с оксидативния агент в концентрация от 100μМ предизвика значително инхибиране на транскрипцията на тези гени, съответно с 60% и 45%, което може да е индикация за наличието на клетъчна специфичност по отношение на отговора към оксидативен стимул.

Едно възможно свързващо звено между действието на оксиданта и проинфламаторните цитокини е транскрипционният фактор NF-kB, на който би могло да се дължи специфичността на клетъчния отговор по отношение на оксидативния стимул.

Както беше демонстрирано, експресията на ензимите от метаболизма на глутатион – GCL и GPx4 е стимулирана, при тези условия на третиране. Очевидно е налице една мобилизирана антистресова защита. Вътреклетъчната концентрация на GSH и редокс статусът вероятно регулират функцията на протеините и чрез глутатионилиране. Такава модификация търпят някои протеини при оксидативен стрес (Ghezzi et al., 2002). Известно е, че също и транскрипционните фактори AP-1 и NF-kB подлежат на глутатионилиране (Pineda-Molina et al., 2001), но ролята на тази модификация е все още неясна (Moskaug et al., 2005).

При изследване ефекта на АЕ върху експресията на проинфламаторния фактор MCP-1 при 3T3-L1 преадипоцити и J774A.1 макрофаги беше установено значително инхибиращо действие на АЕ върху транскрипцията на този ген, като при макрофаги и двете концентрации на

екстракта доведоха до около 50% намаление на експресията. Въпреки инхибиращото въздействие на етиловия алкохол, разликата между неговия ефект и действието на екстракта е значителна. Това означава, че при J774A.1 макрофаги наблюдаваният ефект от третирането с АЕ се дължи и на съединения от екстракта. Въпреки значителния стимулиращ ефект на етиловия алкохол върху транскрипцията на MCP-1, при преадипоцити беше отчетено инхибиращо действие на екстракта от камшик – съдържание на АЕ в хранителната среда от 5% доведе до 70% по-ниско ниво на транскрипция на MCP-1 в сравнение с нетретираната контрола. Инхибиращо действие върху експресията на MCP-1 е описано при множество растителни екстракти и полифенолни съединения (Woo et al., 2007, Norata et al., 2007, Pellegatta et al., 2003, Ishikawa et al., 1999).

Прилагането на АЕ върху 3T3-L1 клетки значително стимулира експресията на другия изследван про-възпалителен цитокин – IL-6. При 3T3-L1 клетки концентрация на АЕ от 2,5% в хранителната среда предизвика шесткратно увеличение в транскрипцията на този цитокин, а двойно по-концентрираният екстракт увеличи синтеза на иРНК на този ген повече от 40 пъти и ефектът бе в зависимост от концентрацията. В литературата се посочва главно инхибиращ ефект на различни растителни екстракти върху експресията на IL-6, като с това се доказва противовъзпалително действие (Xiao et al., 2005).

АЕ при J774A.1 клетки също значително стимулира транскрипцията на IL-6. Докато концентрация на екстракт в хранителната среда от 1,25% все още не оказва забележим ефект върху синтеза на иРНК, то 2,5% съдържание на екстракт стимулира тази синтеза 3,5 пъти. Ефектът на АЕ при адипоцитната клетъчна линия, в сравнение с макрофажната, вследствие действието на една и съща концентрация (2,5%) на екстракта беше двойно по-силен. Тъй като механизмът на NF- κ B опосредстваната регулация е доста комплексен и вероятно зависи от кооперативното действие на повече от един транскрипционен фактор (Lim et al., 2000, Roger et al., 1998, Jaramillo & Olivier, 2002) и коактиватори (Rahman et al., 2006), то е трудно да се даде еднозначно обяснение на стимулиращото действие на екстракта върху експресията на IL-6.

Претретирането на 3T3-L1 преадипоцити с АЕ намали индуциращия ефект на оксидативния стимул върху експресията на MCP-1 (АЕ от 2,5% намали стимулиращия ефект с 30%, а АЕ от 5% – с почти 70%). Подобни резултати докладват и други автори. Yen и съавтори (2011), установяват, че кверцетин, резвератрол и р-кумарова киселина инхибират експресията на MCP-1 в TNF- α стимулирани 3T3-L1 адипоцити.

Представените резултати недвусмислено сочат, че както tButOОН, така и екстрактът от *A. eupatoria* инхибират експресията на MCP-1 в J774A.1 макрофаги. Комбинацията от претретиране с екстракт и последващо третиране с tButOОН води до установяване на още по-ниски нива на експресия на белтъка. Възможно е наличие на синергичен ефект от действието на оксидативния стимул и на компоненти от екстракта върху транскрипцията на MCP-1 при J744A.1 макрофаги.

3T3-L1 преадипоцити претретирани с АЕ показаха по-високи нива на експресия на IL-6 в сравнение както с нетретираната контрола, така и с оксидативно стимулираните клетки. Би могло да се предположи наличието на подобен синергичен ефект между оксидативния стимул и екстракта върху индукцията на генната експресия. Тъй като относителните нива на иРНК, при претретираните с екстракт оксидативно стимулирани клетки са по-ниски от тези на третираните само с АЕ (фиг. 21), то вероятно в този случай е налице по-скоро инхибиране на индуциращия ефект на екстракта от последвалото оксидативно стимулиране, най-вероятно поради протичане на процеси на взаимно неутрализиране. При J774A.1 макрофаги, при които оксидативният стимул потиска експресията на IL-6, претретирането с АЕ възобновява тази експресия, като нивата дори надвишават тези на нетретираната контрола. Двете концентрации на екстракта увеличават транскрипцията трикратно, в сравнение с оксидативно стимулираните клетки и тези нива надвишават базовите (на нетретираната контрола), съответно с 30% и 40%. И в този случай действието на екстракта може да се отдаде на неговите антиоксидантни свойства. Обезвреждането на оксидативния агент ще отслаби инхибиращото му действие върху експресията на IL-6 в макрофаги. В допълнение на това, е налице и стимулиращият ефект на самия екстракт върху тази експресия.

Измерването на експресията на MCP-1 в адипозна тъкан на плъхове на стандартна диета, включваща прием на АЕ, установи значително занижени стойности почти на половина на относителните нива на иРНК, в сравнение с тези при контролната група. При модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения при плъхове приемането на АЕ доведе до 40% понижаване на стойностите на експресия на MCP-1 в адипозна тъкан, в сравнение с неприемалите екстракт животни и до 60%-но понижение, в сравнение с контролната група. Тъй като метаболитните нарушения вследствие обременяването с фруктоза се съпътстват и с индуциране на оксидативен стрес, то наблюдаваният ефект от приложението на екстракта върху MCP-1 би могъл да се обясни с проява на антиоксидантни свойства. Като се има предвид връзката между

оксидативен стрес и възпаление, то участието на съставки от екстракта в процеси на обезвреждане на АКФ, генерирани вследствие на засилен фруктозен метаболизъм, ще отслаби неговия стимулиращ ефект върху експресията на възпалителни фактори, такива като MCP-1.

При плъхове на стандартна диета АЕ предизвиква статистически достоверно увеличение на експресията на IL-6 в адипозна тъкан, в сравнение с неприемалите екстракт животни. В условия на фруктозно натоварване АЕ увеличи транскрипцията на този цитокин. В литературата се докладва предимно за инхибиращо действие на растителни екстракти върху експресията на IL-6 в условия *in vivo*. Такива изследвания са предимно във връзка с доказване на противовъзпалително действие на екстрактите (Arçari et al., 2009, Chuang et al., 2011). Настоящото изследване за първи път установява *in vivo* стимулиращ ефект на растителен екстракт върху експресията на IL-6 в адипозна тъкан на експериментални животни. Механизмите, посредством които АЕ стимулира експресията на IL-6 в адипозна тъкан, вероятно са сходни с тези при преадипоцитни клетъчни култури.

Възниква въпросът на какви свойства се дължи ефектът на АЕ върху експресията на MCP-1 и IL-6. Ако се предположи, че това са антиоксидантни свойства на съединения от екстракта, то лесно може да се обясни инхибиращото действие на АЕ върху тази експресия при нестимулирани клетки, при оксидативно стимулирани 3T3-L1 преадипоцити и в адипозна тъкан на плъхове на нормална диета и на диета с фруктозно обременяване. Тъй като редокс балансът е от значение за регулацията на транскрипционния фактор NF- κ B, то наличието на антиоксиданти би следвало да намали неговата активност. Експресията на другия ген, обаче, за която е известно, че е опосредствана от NF- κ B, беше стимулирана от прилагането на АЕ. Вероятно се намесват и други механизми на действие на съединения от екстракта, описани по-горе. Освен това, трябва да се има предвид, че регулацията на цитокиновата експресия е доста комплексна включваща участието на много транскрипционни фактори и коактиватори.

9. Изследване влиянието на АЕ върху концентрацията на тоталните тиоли при експериментални животни

Влияние на АЕ върху концентрацията на тотални тиоли при плъхове на СД

При животните, приемали АЕ, не беше установена статистически значима промяна в нивата на ТТ в серум и в хомогенат от адипозна тъкан, в сравнение с контролната група, приемала същия вид храна, но без АЕ (табл. 6).

Таблица 6. Концентрация на ТТ в серум и хомогенат от адипозна тъкан на плъхове

| Групи | ТТ в серум | ТТ в хомогенат от адипозна тъкан |
|-------|---------------------|----------------------------------|
| СД | 134,1 ± 19,7 mmol/L | 1,7 ± 0,3 μmol/g тъкан |
| СД+АЕ | 138,5 ± 15,5 mmol/L | 1,9 ± 0,8 μmol/g тъкан |

Влияние на АЕ върху концентрацията на тотални тиоли при плъхове при модел на фруктозо-индуцирани на метаболитни нарушения

Приемът на АЕ доведе до статистически достоверно увеличение на концентрацията на ТТ с 30% в хомогенат от адипозна тъкан на животните, приемали екстракт, в сравнение с тези на фруктозна диета без екстракт (*p<0,05) (табл. 7).

Таблица 7. Концентрация на ТТ в серум и хомогенат от адипозна тъкан на плъхове

| Групи | ТТ в серум | ТТ в хомогенат от адипозна тъкан |
|-------|---------------------|----------------------------------|
| Фр | 126,5 ± 24,3mmol/L | 1,6 ± 0,6 μmol/g тъкан |
| Фр+АЕ | 129,8 ± 14,7 mmol/L | 2,1 ± 0,7* μmol/g тъкан |

*p<0,05

Обсъждане

При плъхове на СД не беше установено значимо повишение на нивата на ТТ в серум и в хомогенат от адипозна тъкан. Установената в настоящия експеримент, макар и незначителна, тенденция за повишение в тези нива, вследствие приема на АЕ би могла да се дължи на антиоксидантните и редуциращите свойства на съединения от екстракта, такива като фенолните. Очаква се, че при обезвреждане на АКФ от полифеноли, се

спестява GSH, нужен за елиминирането им и би следвало да се повишат нивата на измерените тотални тиоли в клетката. Тъй като регулацията на експресията на GCL има основно значение за концентрацията на редуциран глутатион, то е много вероятно нивата на ТТ в хомогенат от адипозна тъкан да се повлияят от индуциращото действие на екстракта и да се променят в резултат на увеличената генна експресия на ензима GCL. Механизмите, чрез които полифенолните съединения могат да увеличат степента на експресия на GCL са описани в предходната глава. По принцип, нивата на GSH не варират в широки граници, поради адаптация на клетката към променящите се условия и това е вероятната причина да не се установява значителна промяна в нивото на тоталните тиоли вследствие на проведеното третиране.

В експеримент с фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения, съпроводено с прием на АЕ, се установиха по-високи нива на ТТ в серум и хомогенат от адипозна тъкан при животните, приемали екстракт, в сравнение с тези, които са били само на обогатена с фруктоза диета. Разликата от 30% в концентрацията на ТТ в хомогенат от адипозна тъкан между двете групи животни беше статистически достоверна. Подобни резултати получават и други автори: Chao и съавтори (2009) изследват влиянието на кафеена и елагова киселини при мишки със стрептозотозин-индуциран диабет. Установяват по-високи концентрации на общ GSH в серума на животните, приемали тези фенолни киселини.

Резултатите от измерването на ТТ в адипозна тъкан кореспондират с резултатите от измерването на нивото на генна експресия на GCL и GPx4. При животните на стандартна диета приемът на екстракт повиши експресията на GCL и понижи експресията на GPx4. Какъвто и да е механизмът на действие на екстракта, то крайният резултат би трябвало да е запазване или увеличаване концентрацията на редуциран GSH, съответно ТТ. Подобно действие на екстракта се наблюдаваше върху експресията на тези ензими и при плъхове на диета, обогатена с фруктоза. В групата на приемалите АЕ животни се установи повишена експресия на GCL и понижена експресия на GPx4. Заедно с това се установи и статистически достоверно увеличение на концентрацията на тоталните тиоли в хомогенат от адипозна тъкан. Тези резултати показват, че АЕ може да повиши антиоксидантния потенциал на адипозна тъкан в условия на фруктозно натоварване. Вероятните механизми на това действие могат да бъдат няколко - промяна в експресията на гени от метаболизма на глутатион, което има за резултат увеличение концентрацията на редуциран глутатион, директно обезвреждане на АКФ, редукция на SH групи, или други.

10. Изследване влиянието на АЕ върху концентрацията на МДА в серум на експериментални животни

Влияние на АЕ върху концентрацията на МДА при плъхове на СД

Приемът на АЕ не доведе до установяване на значителна промяна в концентрациите на МДА в серума на животните (табл. 8).

Таблица 8. Концентрация на МДА в серум на плъхове

| Групи | МДА |
|-------|---------------------------------|
| СД | $2,19 \pm 0,74 \mu\text{mol/L}$ |
| СД+АЕ | $2,05 \pm 0,97 \mu\text{mol/L}$ |

Влияние на АЕ върху концентрацията на МДА в серум при плъхове при модел на фруктозо-индуцирани на метаболитни нарушения

Приемът на АЕ доведе до установяване на по-ниски нива на МДА в групата, приемала екстракт в сравнение с групата на фруктозна диета без АЕ. Понижението в тези нива беше с 36% ($p < 0,05$) (табл.9).

Таблица 9. Концентрация на МДА в серум

| Групи | МДА |
|-------|-----------------------------------|
| Ф | $2,7 \pm 1,68 \mu\text{mol/L}$ |
| Ф+АЕ | $1,73 \pm 0,34^* \mu\text{mol/L}$ |

* $p < 0,05$

Обсъждане

При модели на индуциране на метаболитни нарушения в експериментални животни чрез обременяване с фруктоза е установено увеличение на производството на АКФ и на маркерите на оксидативно увреждане и изчерване на антиоксидантните защитни системи (Faure et al., 1997, Anurag & Anuradha, 2002, Al-Awwadi et al., 2005).

Резултатите от настоящия експеримент показаха, че АЕ не повлиява нивата на МДА в серума на плъхове на стандартна диета. При високофруктозната диета, обаче, бяха отчетени значително по-ниски нива на МДА в серума на животните, приемали екстракт. Тъй като високофруктозната диета се асоциира с увеличено производство на АКФ и състояние на оксидативен стрес, то най-вероятно наблюдаваният ефект на АЕ се дължи на неговите *in vivo* антиоксидантни свойства. Приемът на полифеноли е вероятно свързан с обезвреждане на генерираните в

резултат на усилен фруктозен метаболизъм АКФ и с намаляване на увреждащия им ефект върху мембранните системи. Съответно и измерените нива на МДА ще бъдат по-ниски. Подобни ефекти са доказани при експерименти и с други екстракти и фенолни съединения. Kukongviriyapan и съавтори (2007), например, изследват някои растителни екстракти (*Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* и *Limnophila aromatica*) по отношение на *in vivo* антиоксидантна активност. При експерименти с плъхове установяват по-ниски плазмени нива на МДА при животните, приемали фенилхидразин като индуктор на оксидативен стрес и екстракти от тези растения, в сравнение с групата, приемала само фенилхидразин. Показано е, че кафеена киселина намалява нивата на МДА в еритроцити и черен дроб на ob/ob мишки (Jung et al., 2006). Отново при мишки, но с индуциран диабет Chao и съавтори (2009) установяват протективен ефект на кафеена и елагова киселини, като измерват по-ниски нива на МДА в серума на животните, приемали тези фенолни киселини.

ИЗВОДИ

1. Антиоксидантната активност и концентрацията на полифеноли в екстрактите от повечето от изследваните български лечебни растения са по-високи или съизмерими с тези на избраната група референтни растения.
2. Антиоксидантната активност на екстрактите се дължи в най-голяма степен на съдържанието на фенолни съединения – доказана висока степен на корелация ($r=0,92$).
3. Фракционният анализ на групата от 11 вида български лечебни растения показва най-висока АОА, КП и степен на корелация между тези два показателя в етилацетатната, бутаноловата и тоталната метанолова фракция.
4. В екстракт от *Agrimonia eupatoria* се съдържат фенолните киселини галова, кафеена, канелена и хлорогенова киселина.
5. Жизнеността на преадипоцити намалява при третиране с *t*-ButOОН, приложен в концентрации от 25μМ до 300μМ, докато жизнеността на J774А.1 макрофаги се увеличава при концентрации на *t*-ButOОН от 25μМ до 100μМ, и намалява рязко при концентрации от 150μМ до 300μМ.
6. АЕ стимулира пролиферацията на преадипоцити и макрофаги като цитотоксичен ефект на екстракта беше установен при концентрации над 5% и над 2,5%, съответно.
7. *t*-ButOОН, приложен в концентрации от 50μМ до 100μМ:
 - 7.1. стимулира експресията на GCL и GPx4 в преадипоцити и макрофаги;
 - 7.2. стимулира в преадипоцити и инхибира в макрофаги експресията на проинфламаторните цитокини MCP-1 и IL-6.
8. Водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria*:
 - 8.1. индуцира експресията на GCL и IL-6 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги.
 - 8.2. проявява антиоксидантни свойства, като инхибира експресията на MCP-1 в нестимулирани преадипоцити и макрофаги.
 - 8.3. проявява антиоксидантни свойства, като инхибира експресията на GPx4 в нестимулирани макрофаги.
9. В условия на оксидативно стимулиране водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria* проявява антиоксидантна активност, като:
 - 9.1. понижава стимулиращия ефект на *t*-ButOОН върху експресията на MCP-1 в преадипоцити и GCL в макрофаги;
 - 9.2. неутрализира инхибиращото действие на *t*-ButOОН върху експресията на IL-6 в макрофаги.

10. Екстракт от *Agrimonia eupatoria* стимулира експресията на GCL и IL-6 в адипозна тъкан на плъхове на стандартна диета и при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
11. Екстракт от *Agrimonia eupatoria* проявява антиоксидантна активност като инхибира експресията на MCP-1 и GPx4 в адипозна тъкан на плъхове на стандартна диета и при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
12. Екстракт от *Agrimonia eupatoria* проявява антиоксидантна активност като:
 - 12.1. повишава концентрацията на тоталните тиоли в адипозна тъкан на плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.
 - 12.2. понижава серумните нива на МДА при плъхове при модел на фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения.

ПРИНОСИ

1. За първи път е извършен скрининг на български лечебни растения за наличие на антиоксидантна активност и съдържание на полифеноли във водно-алкохолни екстракти. Показано е, че антиоксидантната активност на екстрактите се определя в най-голяма степен от съдържанието на фенолни съединения.
2. За първи път е установено чрез RP-HPLC анализ наличието на фенолните киселини галова, кафеена и канелена в екстракт от *Agrimonia eupatoria*.
3. За първи път е установено, че t-ButOОН в концентрации от 50μМ до 100μМ: стимулира експресията на редокс сензитивните гени GCL, GPx4, MCP-1 и IL-6 в 3T3-L1 преадипоцити; стимулира експресията на ензимите GCL и GPx4 от обмяната на глутатион и инхибира експресията на цитокините MCP-1 и IL-6 в J774A.1 макрофаги.
4. За първи път е показано, че водно-етанолов екстракт от *Agrimonia eupatoria* може да повлиява експресията на редокс сензитивни гени в клетъчни култури и експериментални животни.
5. За първи път е доказано за растителен екстракт, че стимулира експресията на IL-6 в преадипоцитна клетъчна култура и в адипозна тъкан на плъхове.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В КОНФЕРЕНЦИИ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в пълен текст

1. **Kiselova Y.**, Ivanova D., Trendafilova A., Marinova S., Zapryanova Y., Todorova M., 2011. Antioxidant activity and total phenolic content of fractions from selected Bulgarian medicinal plants. 2nd International Scientific Conference on Medicinal, Aromatic and Spice Plants, 2011, Nitra, Slovakia (под печат)
2. Ivanova D., Tasinov O., Vankova D., **Kiselova-Kaneva Y.**, 2011. Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. Science & Technologies, Medicine, 1, 1, 20
3. Bratoeva K., Bekyarova G., **Kiselova Y.**, Radanova M., Ivanova D., 2010. Metabolic changes in experimental model of metabolic syndrome induced by high-fructose diet in rats. Scripta Scientifica Medica, 42, 4, 233-235
4. Ivanova D., **Kiselova-Kaneva Y.**, Ivanov D., 2009. Antioxidant potential of medicinal herbs from the Northern Black Sea coastal zones. Scripta Scientifica Medica. 41, 1, 7-10
5. **Kiselova Y.**, Chervenkov T., Ivanova D., Galunska B., Geroва D., Yankova T., 2004. Oxidative stress assessment by determination of the amount of total thiols and lipid hydroperoxides in serum. 6-th International Symposium Technomat & Infotel, 2004, Sunny beach, Bulgaria, Scientific articles. 1, 99-106

Участие в конференции

1. Ivanova D., Tasinov O., Vankova D., **Kiselova-Kaneva Y.** Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. 21st International Scientific Conference, Stata Zagora, Bulgaria
2. Ivanova D., **Kiselova-Kaneva Y.**, Vankova D., Tasinov O. Protection by *Agrimonia eupatoria* extract of oxidant-challenged 3T3-L1 pre-adipocyte cells. Abstracts of the 18th European Congress on Obesity (ECO2011), 2011, Istanbul, Turkey, p. 176
3. Ivanova D., **Kiselova-Kaneva Y.** Cytotoxicity of plant extracts from selected Bulgarian herbs with regard to their application as therapeutic agents. NuGOweek 2009, 6th European Nutrigenomics Conference, 2009, Montecatini, Italy, p. 184
4. **Kiselova-Kaneva Y.**, Ivanova D. Bulgarian medicinal plants as a natural source of antioxidants. Advanced FEBS course “Mechanisms, consequences and detection of free radical-mediated oxidative protein modifications”, 2009, Antalya, Turkey, p. 113.
5. **Kiselova Y.**, Ivanova D. Antioxidant activity and polyphenol content of Bulgarian medicinal plants used as folk remedies to control obesity and diabetes. 26th International Symposium on Diabetes and Nutrition Golden Sands, Varna, Bulgaria, 2008, p. 28
6. **Kiselova Y.**, Chervenkov T., Ivanova D., Galunska B., Gerova D., Yankova T. Oxidative stress assessment by determination of the amount of total thiols and lipid hydroperoxides in serum. 6-th International Symposium Technomat & Infotel. Program. 2004, Sunny Beach, Bulgaria. 1, 99-106

Финансиране

COST Action BM0602: **“Adipose Tissue: A Key Target for Prevention of the Metabolic Syndrome”** (2007/2010); Договор № ДКОФ7РП02/13/05.07.2010 г.

МОМН – ФНИ **“Проучване на антиоксидантната, противовъзпалителна и противодиабетна активност на български билки като потенциален ресурс за нутрацевтици”** No ВУ-Л-320/07г. (2007-2010);

Фонд “Медицинска наука”, МУ - Варна **“Проучване върху експериментален модел на метаболитен синдром протективният ефект и оценка на противовъзпалителното, антиоксидантно и хиперлипемично действие на растителни екстракти с високо съдържание на полифеноли”** (2009-2010).